

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Sanidad Animal**



**TESIS DOCTORAL**

**Papel del mecanismo de inmunoadherencia de *Leishmania* en la  
infección humana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Darío Cabañes Rodríguez**

Directores

**Mercedes Domínguez Rodríguez**

**Inmaculada Moreno Iruela**

**Alfredo Toraño García**

**Madrid, 2016**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DEL MECANISMO DE INMUNOADHERENCIA DE  
*LEISHMANIA* EN LA INFECCIÓN HUMANA**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

**Darío Cabañes Rodríguez**

Bajo la dirección de los Doctores:

Mercedes Domínguez, Inmaculada Moreno y Alfredo Torano

Madrid, 2015



Instituto  
de Salud  
Carlos III

---

Unidad de Inmunología Microbiana. Área de Inmunología.  
Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III

Dra. Mercedes Domínguez Rodríguez, Directora de la Unidad de Inmunología Microbiana del Instituto de Salud Carlos III, Dra. Inmaculada Moreno Iruela, Investigadora contratada de la Unidad, y Dr. Alfredo Toraño García, Investigador emérito de la Unidad.

**Certifican:**

Que el trabajo titulado "**Papel del mecanismo de Inmunoadherencia de *Leishmania* en la infección humana**", que presenta el Licenciado en Veterinaria, por la Universidad Complutense de Madrid,

**D. Darío Cabañes Rodríguez**

para optar al grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizado en el Centro de Microbiología, del Servicio de Inmunología del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda.

Y para que así conste a todos los efectos, firmamos el presente en Madrid a 26 de octubre de dos mil quince.

Fdo.: M. Domínguez

Fdo.: I. Moreno:

Fdo.: A. Toraño

*A mis padres*

*A María*

## AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no ha sido un camino fácil, han sido muchas las personas que de una forma u otra me han aportado para ir superando todos los obstáculos. Por ello os agradezco de corazón a todos y cada uno vuestro pequeño gran grano de arena.

Quisiera agradecer en primer lugar a mis **directores de tesis, Mercedes Domínguez, Inmaculada Iruela y Alfredo Toraño**, sin cuyos consejos y dirección a lo largo de los años de labor, cuyo fruto se recoge en esta tesis, este trabajo no habría sido posible.

En segundo lugar he de agradecer a mis **compañeros del Instituto de Salud Carlos III** (Esther, Rebeca, Marta, Sergio, Carmen, David) por su apoyo y por un sinfín de discusiones y comentarios con los que me han orientado cada vez que he tenido necesidad de ellos. He de agradecer a mis **compañeros de VISAVET** (Lucas, Joaquín, Carmina) por ayudarme en todo momento a hacer este estudio realidad, en especial a **Sergio González** por su amistad infinita y su ayuda con los ordenadores, a **Mónica Suarez** por creer en mí incondicionalmente, y a **Carmen Bárcena** por su amistad, empuje y su ejemplo a seguir. En general, debo dar las gracias a todos mis compañeros por el ambiente de compañerismo y colaboración que ha existido durante mi trabajo.

Quiero dar las gracias a mis **padres, mi hermano, familia y amigos** por los ánimos que me han transmitido en todo momento, y por ser parte fundamental de mi vida.

Por último debo agradecer a **María Bravo** por haber recorrido todo este camino a mi lado (y lo que queda por recorrer), por ser una parte esencial de mi vida, por apoyarme, por creer en mí, por aportarme tanto, por todo.

## ÍNDICE



INDICE.....	I
Indice de tablas.....	V
Indice de figuras.....	VI
Abreviaturas.....	VIII

## **1.-INTRODUCCIÓN..... 1**

1.1.- ASPECTOS GENERALES DE LA LEISHMANIOSIS .....	2
1.1.1.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA LEISHMANIOSIS.....	3
1.1.2.- AGENTE ETIOLÓGICO .....	4
1.1.3.- CARACTERÍSTICAS DEL VECTOR.....	6
1.1.4.- CICLO INTRAVECTORIAL DEL PARASITO .....	7
1.2.- MECANISMO INFECTANTE DE <i>LEISHMANIA</i> .....	9
1.3.- INTERACCIÓN DEL PROMASTIGOTE CON EL SISTEMA INMUNITARIO	
INNATO HUMANO .....	11
1.3.1.- ANTICUERPOS NATURALES .....	12
1.3.2.- SISTEMA DEL COMPLEMENTO .....	12
1.3.3.- REACCIÓN DE INMUNOADHERENCIA .....	15
1.3.4.- INTERACCIÓN DEL PROMASTIGOTE INFECTANTE CON LAS CÉLULAS	
FAGOCÍTICAS DE LA SANGRE.....	16

## **2.-OBJETIVOS.....21**

## **3.-MATERIALES Y MÉTODOS.....23**

3.1.- REACTIVOS Y MATERIALES.....	24
3.2.- PROTOZOOS .....	26
3.2.1.- CULTIVO DE PROMASTIGOTES .....	26
3.2.2.- MARCAJE DE LOS PROMASTIGOTES .....	27
3.3.- PROCEDENCIA Y OBTENCIÓN DE LAS SANGRES.....	29
3.3.1.- OBTENCIÓN DE SUEROS.....	29
3.3.2.- AISLAMIENTO DE ERITROCITOS.....	29
3.3.3.- AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS .....	29

3.3.4.- PREPARACIÓN DE SANGRE HUMANA RECONSTITUÍDA .....	30
3.4.- ANTICUERPOS MONOCLONALES .....	31
3.5.- INTERACCIÓN DE LOS PROMASTIGOTES CON CÉLULAS DE LA SANGRE HUMANA.....	32
3.5.1.- INTERACCIÓN CON ERITROCITOS .....	32
3.5.1.1.- FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE INMUNOADHERENCIA (IA) .....	32
3.5.1.2.- CINÉTICA DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE IA .....	32
3.5.1.3.- CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE IA .....	33
3.5.1.3.1.-REACCIÓN DE IA CON SUERO Y ERITROCITOS DE DISTINTOS ÓRDENES DE VERTEBRADOS .....	33
3.5.1.3.2.- CINÉTICA DE LISIS DE PROMASTIGOTES EN PRESENCIA O AUSENCIA DE ERITROCITOS.....	34
3.5.2.- INTERACCIÓN CON LEUCOCITOS.....	35
3.5.2.1.-ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DEL COMPLEJO DE IA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS.....	35
3.5.2.2.-CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS ACEPTORAS DE PROMASTIGOTES EN SANGRE .....	35
3.5.2.3.-CINÉTICA DE UNIÓN DE PROMASTIGOTES A GRANULOCITOS Y MONOCITOS EN SANGRE .....	36
3.5.2.4.- CINÉTICA DE INTERIORIZACIÓN DE LOS PROMASTIGOTES EN LOS LEUCOCITOS DE LA SANGRE.....	37
3.5.2.5.-IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES CELULARES IMPLICADOS EN LA UNIÓN/INTERIORIZACIÓN DE LOS PROMASTIGOTES.....	39
3.6.- CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR TRAS LA INFECCIÓN POR <i>LEISHMANIA</i> .....	40
3.6.1.- DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS.....	40
3.6.2.-DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN GRANULOCITOS.....	40
<b>4.-RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
4.1.-INTERACCIÓN DE LOS PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA</i> CON LAS CÉLULAS DE LA SANGRE HUMANA.....	43



4.1.1.- INTERACCIÓN CON LOS ERITROCITOS: REACCIÓN DE IA .....	43
4.1.2.- CARACTERIZACIÓN DE OTROS COMPONENTES CELULARES SANGUÍNEOS QUE INTERACCIONAN CON EL COMPLEJO DE IA .....	48
4.1.2.1.- INTERACCIÓN DE LOS PROMASTIGOTES CON LOS LEUCOCITOS.....	54
4.1.2.1.1.- UNIÓN DE LOS PROMASTIGOTES A LAS DISTINTAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS DE LA SANGRE.....	54
4.1.2.1.2.-CINÉTICA DE UNIÓN E INTERIORIZACIÓN DE LOS PROMASTIGOTES DEL INÓCULO INFECTIVO A GRANULOCITOS Y MONOCITOS.....	57
4.1.2.1.3.-RECEPTORES CELULARES IMPLICADOS EN LA INFECCIÓN DE SANGRE POR <i>LEISHMANIA</i> .....	62
4.2.- CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR TRAS LA INFECCIÓN DE LA SANGRE HUMANA POR <i>LEISHMANIA</i> .....	65
4.2.1.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS POR GRANULOCITOS Y MONOCITOS DURANTE LA INFECCIÓN EX VIVO DE SANGRE HUMANA POR PROMASTIGOTES DE <i>L. AMAZONENSIS</i> .....	65
4.2.2.-PRODUCCIÓN DE ROS EN GRANULOCITOS DE SANGRE HUMANA TRAS LA INFECCIÓN EX VIVO POR <i>LEISHMANIA</i> .....	67
<b>5.-DISCUSIÓN .....</b>	<b>69</b>
<b>6.-CONCLUSIONES .....</b>	<b>77</b>
<b>7.-RESUMEN .....</b>	<b>79</b>
<b>8.-SUMMARY .....</b>	<b>83</b>
<b>9.-BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>87</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Combinaciones de promastigotes, suero y eritrocitos para caracterizar la reacción de inmunoadherencia.....	33
<b>Tabla 4.1.</b> Formación de complejos de inmunoadherencia entre eritrocitos de distintos vertebrados y promastigotes opsonizados con sueros homólogos y heterólogos .....	46
<b>Tabla 4.2.</b> Porcentaje de unión de promastigotes a leucocitos a distintos tiempos .....	52
<b>Tabla 4.3.</b> Porcentajes de granulocitos o monocitos que unen cada una de las interleucinas analizadas.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1.1.	Distribución mundial de la leishmaniosis .....	2
Fig 1.2.	Promastigote y amastigote de <i>Leishmania</i> spp .....	5
Fig 1.3.	Hembra de flebótomo .....	6
Fig 1.4.	Ciclo vital de un flebótomo spp .....	7
Fig 1.5.	Ciclo intravectorial de <i>Leishmania</i> .....	8
Fig 1.6.	Ciclo biológico de la leishmaniosis en humanos .....	9
Fig 1.7.	Activación del sistema del complemento por las vías clásica, alternativa y de las lectinas .....	13
Fig 1.8.	Complejo de ataque a la membrana (MAC).....	14
Fig 1.9.	Interacción de <i>Leishmania</i> con células fagocíticas.....	17
Fig 3.1.	Curva de crecimiento de promastigotes de <i>L. amazonensis</i> .....	26
Fig 3.2.	Promastigotes <i>L. amazonensis</i> marcados con CMFDA al microscopio de fluorescencia.....	28
Fig 3.3.	Aislamiento de leucocitos de la sangre.....	30
Fig 3.4.	Purificación de un AcM conjugado con FITC .....	31
Fig 3.5.	Representación en diagramas de puntos de la cinética de unión de promastigotes de <i>L. amazonensis</i> -CMFDA a los granulocitos de la sangre.....	36
Fig 4.1.	Visualización de los complejos de IA al microscopio óptico entre promastigotes y eritrocitos humanos.....	43
Fig 4.2.	Cinética de la reacción de IA para <i>L. amazonensis</i> y <i>L. infantum</i> .....	44
Fig 4.3.	Cinéticas de unión de promastigotes-CMFDA a eritrocitos de distintas especies de vertebrados .....	45
Fig 4.4.	Cinética de lisis de promastigotes de <i>L. amazonensis</i> en presencia o ausencia de eritrocitos .....	47
Fig 4.5.	Curso de liberación de los promastigotes-CMFDA desde los complejos de IA .....	48
Fig 4.6.	Cinéticas de transferencia de <i>L. amazonensis</i> en sangre completa y modificada .....	50
Fig 4.7.	Cinéticas de unión de promastigotes-CMFDA a leucocitos de sangre durante 15 minutos.....	51

<b>Fig 4.8.</b>	Cinéticas de unión de promastigotes-CMFDA de <i>L. amazonensis</i> en sangre modificada durante 60 minutos .....	52
<b>Fig 4.9.</b>	Cinética de transferencia de promastigotes-CMFDA opsonizados.....	53
<b>Fig 4.10.</b>	Porcentaje de subpoblaciones de leucocitos de la sangre que unen promastigotes.....	55
<b>Fig 4.11.</b>	Análisis porcentual de la unión de promastigotes-CMFDA en cada subpoblación leucocitaria.....	56
<b>Fig 4.12.</b>	Imágenes al microscopio de fluorescencia de leucocitos después de haber sido infectados por <i>Leishmania</i> .....	57
<b>Fig 4.13.</b>	Determinación de los porcentajes de leucocitos que interiorizan promastigotes en la infección humana por <i>Leishmania</i> .....	59
<b>Fig 4.14.</b>	Cinética de unión e interiorización de promastigotes de <i>L. amazonensis</i> a leucocitos de la sangre humana.....	61
<b>Fig 4.15.</b>	Inhibición de la cinética de inmunoadherencia de <i>L. amazonensis</i> y eritrocitos humanos.....	63
<b>Fig 4.16.</b>	Inhibición de la transferencia de promastigotes a granulocitos y monocitos de la sangre .....	64
<b>Fig 4.17.</b>	Producción de citoquinas por leucocitos tras la infección por <i>Leishmania</i> de una muestra de sangre humana .....	66
<b>Fig 4.18.</b>	Cinética granulocitos que producen ROS .....	68

## ABREVIATURAS

AcM: anticuerpos monoclonales  
AcN: anticuerpos naturales  
BD: Becton Dickinson  
C1: primer componente del sistema del complemento  
C1q, C1r, C1s: subunidades del componente C1q del complemento  
C2: segundo componente del sistema de complemento  
C2a: fragmento derivado de la escisión del C2  
C2b: fragmento derivado de la escisión del C2  
C3: tercer componente del sistema del complemento  
C3a: fragmento derivado de la escisión del C3  
C3b: fragmento derivado de la escisión del C3  
C3bi: fragmento del C3b inactivado  
C4: cuarto componente del sistema de complemento  
C4a: Fragmento derivado de la escisión del C4  
C4b: Fragmento derivado de la escisión del C4  
C4bp: C4 "binding protein"  
C5: quinto componente del sistema del complemento  
C5a: fragmento derivado de la escisión del C5  
C5b: fragmento derivado de la escisión del C5  
C6: sexto componente del sistema del complemento  
C7: séptimo componente del sistema del complemento  
C8: octavo componente del sistema del complemento  
C9: noveno componente del sistema del complemento  
CMFDA: del inglés "5-chloromethylfluorescein diacetate"  
CR1 (CD35): receptor celular para el fragmento C3b  
CR3 (CD11b, CD18): receptor celular para el fragmento C3bi  
DC: células dendríticas  
EDTA: etilendiaminotetraacetato  
EE: error estándar de la media  
E<sub>c</sub>: eritrocitos de conejo  
E<sub>H</sub>: eritrocitos humanos  
E<sub>R</sub>: eritrocitos de ratón  
Fc: fragmento constante de las inmunoglobulinas  
FcR: receptor para el fragmento Fc de la inmunoglobulinas  
fB: Factor B del complemento  
fD: Factor D del complemento  
fH: Factor H del complemento  
FITC: isotiocianato de fluoresceína  
FL1: detector de fluorescencia de longitud de onda 530/30 nm  
FL2: detector de fluorescencia de longitud de onda 585/42 nm  
FSC: del inglés "forward scatter collected"  
IA: inmunoadherencia  
IC: inmunocomplejo  
IFN: interferón  
IL: interleucina  
L: linfocitos  
M: monocitos

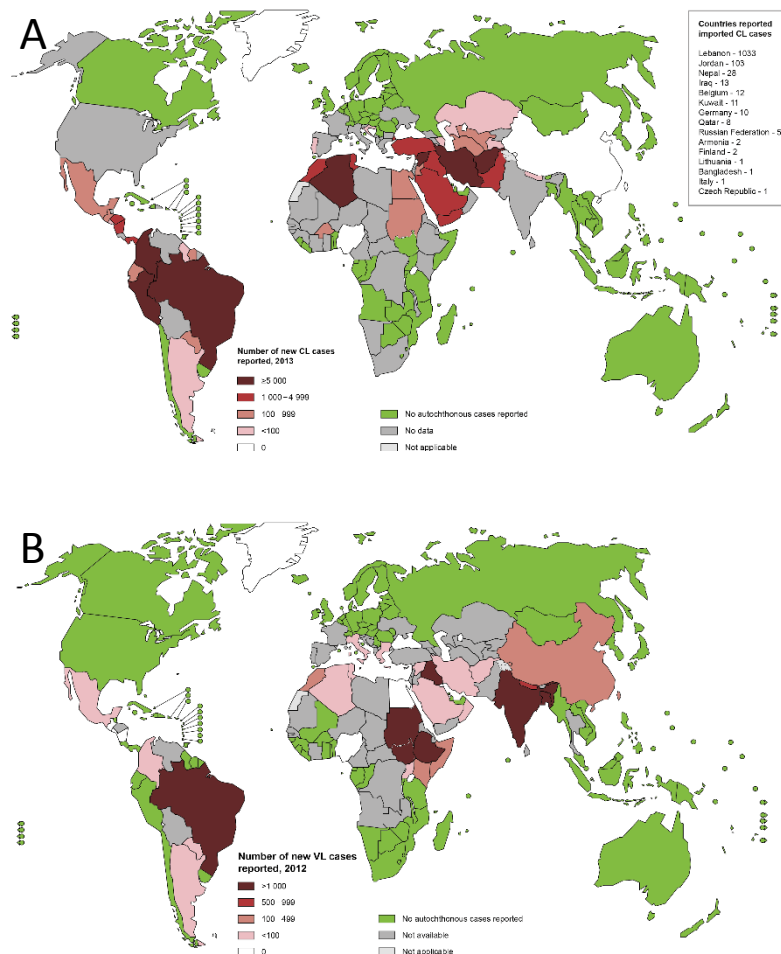
MAC: complejo de ataque a membrana de la vía lítica del complemento  
MBL: del inglés "Mannan binding lectin"  
NK: células citotóxicas naturales (natural killer)  
PBS: tampón fosfato sódico-potásico  
PMA: Ester de forbol 12-miristato 13-acetato  
PMN: neutrófilos polimorfonucleares  
P: Properdina  
SHN: suero humano normal  
SSC: del inglés "side scatter collected"  
TB: azul de tripano  
TGF: del inglés "transforming growth factor"  
TNF: del inglés "tumor necrosis factor"  
VA: vía alternativa del complemento  
VC: vía clásica del complemento  
VL: vía de la lectina del complemento  
YP: yoduro de propidio

## 1.- INTRODUCCIÓN



## 1.1.- ASPECTOS GENERALES DE LA LEISHMANIOSIS

La leishmaniosis es una zoonosis causada por protozoos hemoflagelados del género *Leishmania* que se transmite al hombre y a otros mamíferos a través de la picadura de un díptero de la subfamilia *Phlebotominae* (2)(3). La leishmaniosis es endémica en 88 países pertenecientes a los más variados ecosistemas que incluyen el subcontinente Asiático, el Oriente Próximo, la Cuenca Mediterránea, el este, norte y región subsahariana de África, regiones del Caribe, y en Iberoamérica desde el sur de Tejas hasta el norte de Argentina. La leishmaniosis es enfermedad de declaración obligatoria en 33 de los 88 países afectados. Su incidencia oscila entre 1,5 y 2 millones de infecciones distribuidas en viscerales (500.000) y cutáneas (1,5 millones).



**Figura 1.1. Distribución mundial de la leishmaniosis:** en A se muestra el mapa de distribución mundial de leishmaniosis cutánea y en B de leishmaniosis visceral según la OMS en el año 2013. (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>)



El 90% de los individuos afectados se localiza en cinco países: India (estado de Bihar), Bangladesh, noroeste de Nepal, Brasil y Sudán (4)(5). El número de personas que moran en zonas de riesgo se estima en 350 millones, la prevalencia de la infección alcanza los 12 millones de casos, y es causa de unos 67.500 óbitos anuales (6). La alta morbilidad de la leishmaniosis representa un considerable lastre económico para el progreso de los países afectados que se encuentran entre los más pobres del planeta. Cabe señalar que la leishmaniosis se encuadra entre las 12 enfermedades infecciosas importantes relegadas sanitariamente.

### 1.1.1.- Manifestaciones clínicas de la leishmaniosis

La leishmaniosis humana se expresa como un conjunto de síndromes de variable virulencia dependiendo de la especie de *Leishmania* infectante y del estado de salud del hospedador. Las leishmaniosis se han clasificado bajo tres síndromes clínicos: cutánea, mucocutánea y visceral.

La leishmaniosis cutánea incluye dolencias dérmicas o tegumentarias que pueden ser localizadas o diseminadas y, generalmente, benignas. En amplias regiones del Oriente Próximo, Asia central y norte de África el agente etiológico de la leishmaniosis cutánea es *L. major*, y su manifestación característica el "botón de oriente" o "botón de Alepo". En áreas urbanas del Oriente Medio, el subcontinente Indio y regiones de la Cuenca Mediterránea es frecuente la infección dérmica causada por *L. tropica*. Dentro de los procesos tegumentarios la afectación dérmica localizada se denomina forma tuberculoide, y la diseminada, lepromatosa. En la primera el hospedador mantiene su inmunidad celular activa; en la lepromatosa, la respuesta celular se encuentra deprimida y potenciada la inmunidad humoral.

La leishmaniosis mucocutánea se da en zonas de Centroamérica y Sudamérica. Presenta sintomatología polar, uno de cuyos polos lo ocupa la leishmaniosis cutánea americana clásica (ACL), y el otro, la leishmaniosis cutánea difusa (DCL). Se da también una forma intermedia de leishmaniosis cutánea diseminada, con abundancia de lesiones papulares, ausencia de nódulos y patrón granulomatoso acompañada de lesiones que metastatizan a las mucosas faciales. Esta forma se asocia a la infección por *L. amazonensis* y *L. braziliensis*.

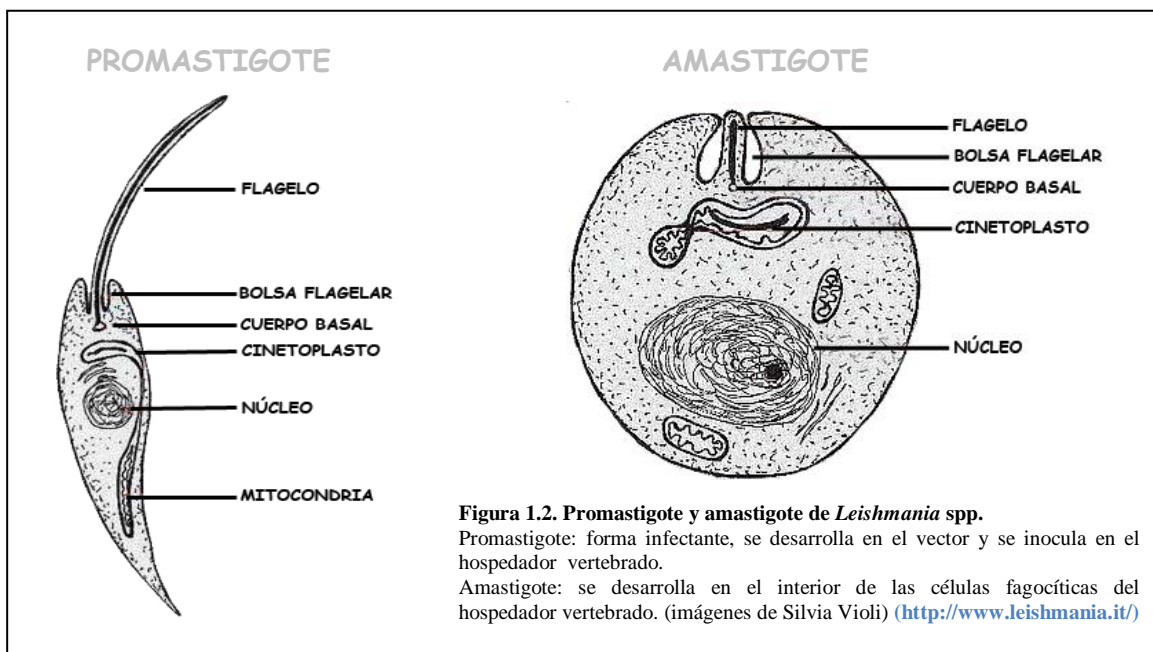
La leishmaniosis visceral o kala-azar es endémica en regiones de África, India, Iberoamérica y de la cuenca mediterránea. En el Viejo Mundo la causan *L. donovani* y *L. infantum*, y en el Nuevo Mundo, *L. chagasi* (similar a *L. infantum*). Un alto porcentaje de los pacientes tratados de leishmaniosis visceral por *L. donovani* desarrolla como secuela la leishmaniosis dérmica post-kala-azar, síndrome similar a la leishmaniosis cutánea diseminada y a la lepra lepromatosa. El parásito coloniza los macrófagos de los nódulos linfáticos, la médula ósea y órganos viscerales (hígado y bazo). La multiplicación de los amastigotes causa la hepatomegalia y esplenomegalia características de esta enfermedad, que sin tratamiento llega a ser mortal. En la Cuenca Mediterránea y el Suroeste de Europa el agente de la leishmaniosis visceral y cutánea es *L. infantum*. La leishmaniosis es más frecuente en el perro que en el hombre, siendo el perro el principal reservorio de *L. infantum*.

### 1.1.2.- Agente etiológico

El agente etiológico de la leishmaniosis es un protozoo perteneciente al orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* y género *Leishmania*. El genoma de las especies del Viejo Mundo (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*) se organiza en 36 cromosomas, mientras que las especies del Nuevo Mundo como *L. mexicana* y *L. braziliensis* poseen 34 y 35 cromosomas respectivamente (7). *L. infantum*, causante de la leishmaniosis en la Cuenca Mediterránea y Suroeste de Europa, posee 36 y su genoma haploide codifica 8.195 genes (4). Se han descrito unas veinte especies del género *Leishmania* como responsables del espectro de formas clínicas de la enfermedad (8).

Los protozoos del género *Leishmania* son tripanosomátidos digénicos cuya reproducción se ha considerado históricamente como asexual por división binaria. Actualmente se cree que *L. major* y *L. braziliensis* desarrollan un ciclo sexual y procesos meióticos dentro del flebótomo (9). El ciclo biológico de *Leishmania* es heteroxénico que incluye el paso desde un vector invertebrado a un hospedador mamífero y viceversa; realiza parte de su ciclo biológico en el intestino del flebótomo como forma flagelada o promastigote, y la otra en el interior de los macrófagos del hospedador vertebrado, como forma aflagelada o amastigote.

El promastigote es una célula fusiforme de 15 a 20 micrómetros de longitud y de 1,5 a 2,5 micrómetros de ancho, con núcleo central, y en el polo apical el cinetoplasto, una estructura cóncavo-discoïdal formada por moléculas de ADN mitocondrial. Posee diversos orgánulos de carácter secretor (retículo endoplásmico, aparato de Golgi) y metabólico (glucosoma, acidocalcisoma). La superficie del promastigote está cubierta por glucoconjugados (glucoproteínas, glucolípidos, enzimas y proteofosfogluanos) que desempeñan un papel importante en la interacción del parásito con el vector y con el hospedador vertebrado. Un glucoconjugado importante es el lipofosfogluano (LPG) que forma el denso glucocaliz ( $\sim 1-5 \times 10^6$  moléculas/célula) que rodea a la membrana plasmática. Otros proteofosfogluanos incluyen el proteofosfogluano de estructura filamentosa (fPPG) que secretan los promastigotes en la región torácica del tracto digestivo del flebótomo y que se cree potencia la infectividad del parásito (10).



La forma amastigote es sésil y reside como huésped obligatorio en los fagocitos mononucleares del hospedador vertebrado. Es una célula ovoide de entre 10 y 30 micrómetros de longitud y 3 a 5 micrómetros de diámetro, con núcleo voluminoso y cinetoplasto. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi son muy reducidos; su aparato lisosómico es abundante y posee grandes vacuolas (megasomas). El flagelo está limitado a una pequeña fibrilla rodeada por la bolsa flagelar. Los principales componentes de la

superficie son glucolípidos anclados a la membrana a través de un residuo de glucofosfatidilinositol (GPI).

### 1.1.3.- Características del vector

La leishmaniosis la transmiten los flebótomos, insectos nematóceros pertenecientes a la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae*, que colonizan un amplio rango de hábitats tropicales y subtropicales. Los flebótomos son dípteros de pequeño tamaño (2-3 mm de largo y menos de 1 mm de ancho), de alas lanceoladas y largas patas, y con un aparato bucal cortador-chupador en forma de probóscide. Los mosquitos poco voladores, pican silenciosamente en horas de escasa luminosidad y son activos a temperaturas superiores a 15 °C. Los machos son exclusivamente fitófagos y las hembras hematófagas que utilizan la ingesta de sangre para madurar los folículos ováricos (anautogenia) y realizar la ovoposición. La hematofagia de las hembras determina que los flebótomos sean importantes en salud pública ya que transmiten protozoos (*Leishmania*), virus (fiebre papatacci) y bacterias (*Bartonella*), al hombre y animales.



Figura 1.3. Hembra de flebótomo (Dr. Edgar Rowton / Walter Reade).  
(<http://www.doctorswithoutborders.org/>)

Las especies de la subfamilia *Phlebotominae* se agrupan en seis géneros, tres pertenecientes al Viejo Mundo: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* y *Chinius*, y tres propios de América: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Wariley*. En los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* se encuentran las especies antropofílicas que transmiten la leishmaniosis. Se han descrito unas 80 especies y subespecies de flebótomos que actúan como probables vectores de

*Leishmania*; de ellas, 19 son vectores probados, y las otras 14 se encuentran en fase de confirmación (8).

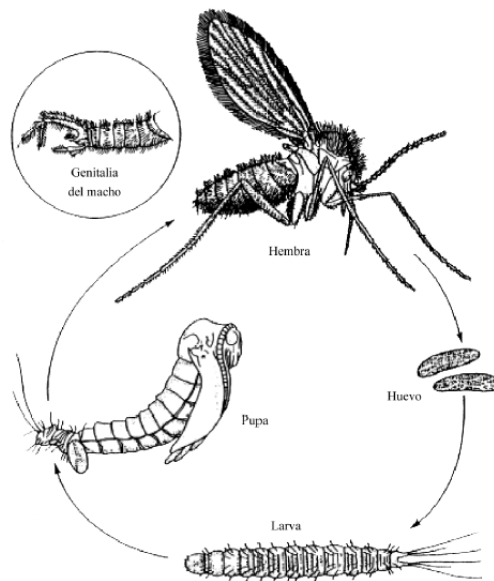


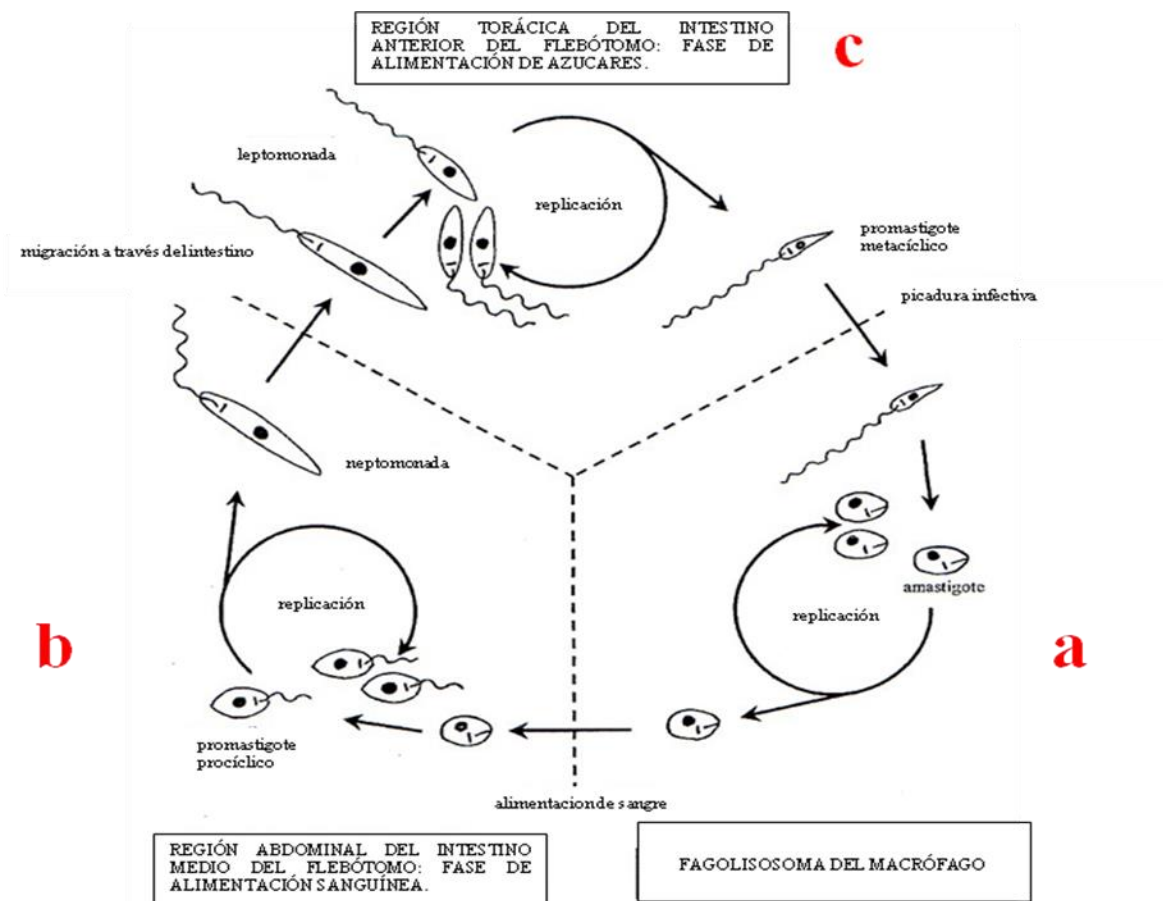
Figura 1.4. Ciclo vital de un flebótomo spp.  
(<http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library>).

#### 1.1.4.- Ciclo intravectorial del parásito

El flebótomo es un díptero de hábito telmófago. Al picar perfora la piel con su probóscide buscando las vénulas de la dermis del hospedador, las lacera y produce un pequeño hematoma a partir del cual ingiere la sangre. Si la sangre procede de un animal enfermo de leishmaniosis, el flebótomo puede ingerir el parásito en forma de amastigote e infectarse. En el vector, el amastigote experimenta diversas transformaciones morfológicas y estructurales siguiendo un proceso programado de desarrollo. P.A. Bates y colaboradores han descrito las distintas etapas de la diferenciación del parásito en el interior del vector: amastigotes → promastigotes procíclicos → nectomónadas y leptomónadas → haptomónadas y promastigotes metacíclicos (1).

Se han diferenciado dos etapas en función del tipo de alimentación de los promastigotes: la primera de alimentación de sangre, y una segunda basada en la ingesta de azúcares. A partir de estos nutrientes los promastigotes procíclicos en la primera etapa y los leptomónadas en la segunda se multiplican activamente desarrollando dos ciclos

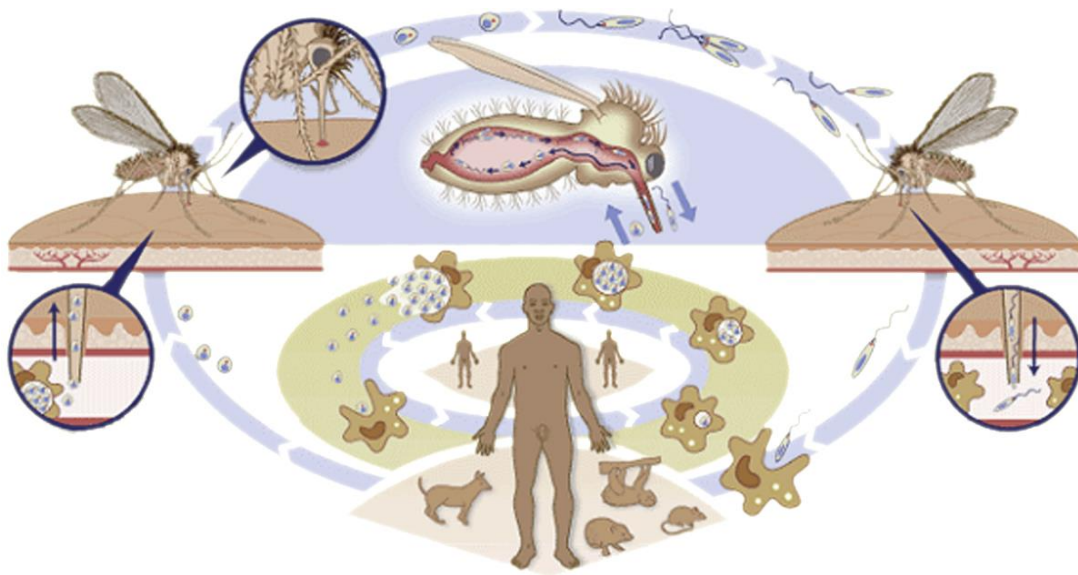
independientes de multiplicación en el interior del vector. Entre estas dos etapas las formas nectomónadas, sin capacidad de dividirse, son las responsables de la migración hacia la probóscide y de consolidar la infección en el mosquito tras la ingesta. En su estadio final las formas leptomónadas y/o haptomónadas se diferencian en promastigotes muy móviles, carentes de capacidad de división, resistentes al complemento, y altamente infectantes denominados promastigotes metacíclicos. Este proceso de diferenciación recibe el nombre de metaciclogénesis. Con la aparición de promastigotes metacíclicos en la probóscide y finalizado el ciclo gonotrófico, el flebótomo se apresta a realizar una nueva ingesta de sangre y reiniciar el ciclo infectante.



**Figura 1.5. Ciclo intravectorial de *Leishmania*.** a) los amastigotes se multiplican dentro del fagolisosoma del macrófago; b) los promastigotes procíclicos se multiplican en la región abdominal del intestino medio; c) los promastigotes leptomónadas se multiplican en la región torácica del intestino medio (1) (<http://dna.kdna.ucla.edu/>).

## 1.2.- MECANISMO INFECTANTE DE *LEISHMANIA*

Durante la ingesta de sangre del vector la hembra infectada regurgita promastigotes en el hematoma dérmico del hospedador. Para mantener la hemostasis durante su alimentación el flebótomo inyecta saliva en el hematoma. La saliva contiene diversas sustancias de carácter flogístico: vasodilatadoras, anticoagulantes (en *L. longipalpis* el maxadilán, en *P. papatasi* PpSP15) (11), inflamatorias (12)(13), etc., que facilitan la ingesta del díptero y, por tanto, la transmisión del parásito (14)(15).



**Figura 1.6. Ciclo biológico de la leishmaniosis en humanos.** La hembra del flebótomo inocula los promastigotes infectivos durante la ingesta de sangre (1). Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos (2) y se transforman en amastigotes (3). Los amastigotes se multiplican en el interior de las células infectadas (4), para terminar rompiéndolas, liberándose por el organismo o entrando en un nuevo macrófago (5). Un nuevo flebótomo se infecta al ingerir sangre con macrófagos infectados con amastigotes (6). En el tracto intestinal del mosquito, los parásitos se diferencian a promastigotes (7), los cuales se multiplican y migran a la probóscide (8), listos para volver a ser inoculados. © WHO ([www.liquidjigsaw.com](http://www.liquidjigsaw.com)).

En contacto con la sangre humana los promastigotes interactúan con componentes del sistema inmune innato, fijan anticuerpos naturales (AcN) anti*Leishmania* y se activa el sistema del complemento depositándose fragmentos del componente C3 en la superficie del parásito (16). Los promastigotes opsonizados son captados rápidamente a través del C3b por los receptores CR1 (CD35) del eritrocito produciéndose la reacción de inmunoadherencia (IA); en los mamíferos no primates, la reacción de IA se produce con las plaquetas (17). Unidos a los eritrocitos en forma de complejos de IA los promastigotes se

transfieren a los leucocitos del hematoma (principalmente granulocitos y monocitos), y son endocitados a través de un mecanismo en el que participan receptores celulares. En el interior del fagolisosoma macrofágico el promastigote se transforma en amastigote e interfiere con los mecanismos de activación de la célula, lo que facilita el implante de la infección. La proliferación del parásito produce la muerte de la célula hospedadora, y los amastigotes liberados invaden los macrófagos del tejido circundante y se diseminan por vía hematológica colonizando órganos distales al lugar de la inoculación: médula ósea, hígado y bazo. El ciclo infectante se cierra, cuando un nuevo flebótomo que se alimenta en un hospedador infectado ingurgita monocitos parasitados.



### 1.3.- INTERACCIÓN DEL PROMASTIGOTE CON EL SISTEMA INMUNITARIO INNATO HUMANO

El sistema inmunitario de vertebrados posee dos ramas funcionales: el sistema inmune innato, que actúa como primera barrera frente a la entrada de agentes extraños, y el sistema inmune adaptativo, dotado de la capacidad de desarrollar respuestas protectoras de gran intensidad y especificidad.

El sistema inmune innato está constituido por barreras físicas (epidermis y mucosas) y por componentes plasmáticos y celulares. Entre los factores humorales destacan los anticuerpos naturales (AcN), el sistema del complemento, y las familias de opsoninas conocidas como colectinas y pentraxinas **(18)**. Los elementos celulares pertenecen en su mayoría a la estirpe mieloide, e incluyen a los fagocitos profesionales (granulocitos y monocitos/macrófagos), las células dendríticas presentadoras de antígeno, las células citotóxicas naturales NK ("natural killer"), células NKT y  $T\gamma\delta$ , y células de epitelios y mucosas **(18)**. La mayoría de estas células expresan receptores de superficie e intracitoplasmáticos denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) a través de los cuales exploran el universo antigénico y la presencia de patrones moleculares conservados del mundo microbiano (PAMPs). Entre dichos receptores se encuentran las familias Toll-like (TLR) localizados principalmente en la membrana/transmembrana celular **(19)**, y las familias de receptores NLR ("NOD-like receptors") **(20)** y RLH ("RIG-I-like helicases") **(21)** presentes en compartimentos citosólicos de la célula. Los macrófagos de mamíferos expresan además receptores de superficie pertenecientes a una familia de lectinas tipo C que funcionan como "barrenderos" ("scavenger"); entre ellos están los receptores SR-A y MARCO, el receptor de  $\alpha$ -mananos (MR), la langerina, la dectina-1 que une  $\beta$ -glucanos, el CD14, los DC-Sign y L-Sign, el receptor de mucosa-manosa, y el/los receptor/es para productos de glucosilación avanzada. La señalización a través de estos receptores suele confluir en la inducción del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que activa la secreción de citocinas proinflamatorias y la expresión de las moléculas co-estimuladoras B7.1(CD80) y B7.2 (CD86) en la membrana de los fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos, células dendríticas) que son necesarias para la activación de las células T vírgenes. Conjuntamente con células y opsoninas, participan en la respuesta innata una variedad de citocinas y quimiocinas que actúan como factores hormonales y quimiotácticos

facilitando las conexiones entre distintas poblaciones leucocitarias en la inducción de las respuestas inflamatoria y efectora del sistema inmunológico.

### **1.3.1.- Anticuerpos naturales**

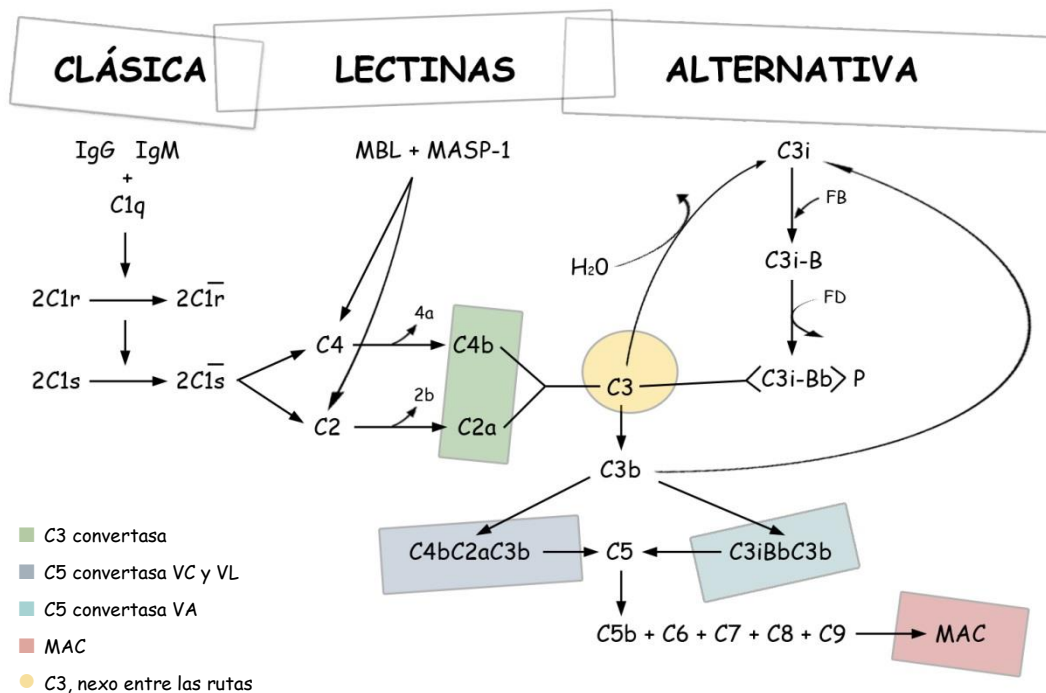
Los primeros componentes del sistema humoral innato que interaccionan con los promastigotes en el hematoma dérmico son los AcN y la colectina denominada "mannan binding lectin" (MBL). Los AcN son inmunoglobulinas que están presentes en el suero de sujetos que no han sido inmunizados intencionadamente. Su afinidad por el antígeno suele ser menor que la de los anticuerpos generados por inmunización, aunque la avidéz es equivalente. Los AcN se detectan en el suero de prácticamente la totalidad de los vertebrados (22). Suelen ser polirreactivos, reconocen antígenos propios y extraños, se sintetizan desde una etapa temprana en la ontogenia, y sus parátomos poseen variabilidad reducida. Pertenecen principalmente al isotipo IgM, y en menor proporción a los isotipos IgG e IgA. En el suero humano normal, se ha descrito la existencia de AcN que reconocen epítomos de *Leishmania* (16)(23)(24).

### **1.3.2.- Sistema del complemento**

Constituye uno de los principales mecanismos de defensa del sistema de resistencia innata de los vertebrados. Entre sus funciones destacan la actividad opsonizante de microorganismos y células propias senescentes o alteradas, la generación de quimiocinas que incrementan la fagocitosis, y de anafilatoxinas que desencadenan respuestas inflamatorias, el aclaramiento de inmunocomplejos (ICs) y eliminación de células apoptóticas, la inducción de la respuesta humoral adaptativa, y la colaboración con elementos efectores de dicha respuesta en la lisis de agentes patógenos para el hospedador. Está compuesto por algo más de una veintena de proteínas plasmáticas y de una docena de receptores celulares. Sus funciones se manifiestan tras la activación de los componentes iniciales lo que conduce a la hidrólisis enzimática secuencial del resto de las proteínas del sistema; en este proceso cada componente activa al siguiente generando un

mecanismo de amplificación en cascada que permite al sistema alcanzar en muy poco tiempo la máxima capacidad efectora.

Se conocen tres vías de activación del complemento, la vía clásica (VC), la vía de las lectinas (VL) y la vía alternativa (VA) que, aunque descritas como independientes, suelen activarse simultáneamente y confluyen en la proteólisis del C3, componente central del sistema.



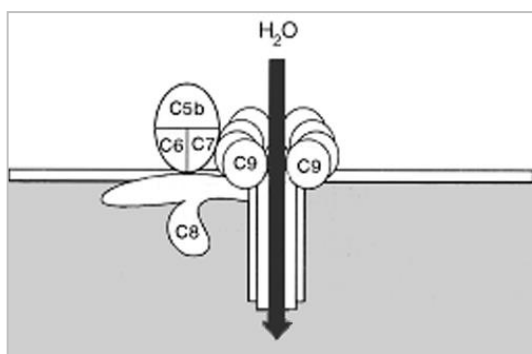
**Figura 1.7. Activación del sistema del complemento por las vías clásica, alternativa y de la lectina.** Los componentes de la vía clásica y lítica se designan con la letra C seguida de un número (C1, C2, C5...); los de la alternativa se simbolizan con letras (B, D...) y los productos de la activación y degradación de las moléculas nativas llevan un sufijo literal (C3a, C3bi).

La VC se activa por unión del componente C1 (C1q, C1r y C1s) a las inmunoglobulinas, a ICs o a superficies antigénicas. La unión del C1q autoactiva el zimógeno C1r-C1s que digiere a los componentes C4 y C2 formando el complejo C4b2a denominado C3-convertasa de la vía clásica, una serina proteasa dependiente de  $Mg^{2+}$  que escinde al C3 en C3a y C3b. El péptido C3a se libera como anafilatoxina, y el C3b unido covalentemente a la superficie antigénica por el grupo tioléster actúa, al igual que el C4b, de opsonina. Los componentes que regulan la activación de la VC son el C1-INH, proteína plasmática que bloquea la

activación de las serina-proteasas de C1 y MASPs, la C4bp que desplaza y disocia al C4b de la C3-convertasa (C4b2a), y los factores DAF y CR1 que participan en la disociación de las C3- (C4b2a) y C5- (C4b2a3b) convertasas.

La VL se activa por unión de la lectina que une manosa (MBL) a sacáridos neutros como manosa o N-acetil-glucosamina; su unión activa las serina proteasas (MASPs) asociadas a MBL que degradan C4 y C2 formando nuevas moléculas de C3-convertasa (C4b2a).

La VA es un importante componente de la inmunidad natural. En ella participan los factores B (fB), D (fD) y P (properdina), además del C3, común a las tres vías. Una minúscula fracción del C3 en la circulación se hidroliza espontáneamente (C3 tick-over) generando moléculas de C3(H<sub>2</sub>O) inestables; esta molécula en presencia de fB y fD forma una C3-convertasa soluble C3(H<sub>2</sub>O)Bb que digiere el C3 y deposita C3b en superficies carentes de ácido siálico y polianiones (superficies activadoras). El C3b depositado es sustrato para el fB formando C3bB, que digerido por el fD en Ba y Bb, da lugar a la C3-convertasa de la vía alternativa (C3bBb). La unión de properdina al C3bBbP dota al enzima de mayor estabilidad lo que multiplica la cantidad de fragmentos de C3b depositados. Las superficies no activadoras favorecen la fijación del factor H (fH) al C3b depositado; esta interacción inhibe la unión C3b-fB y bloquea la activación de la VA. La adición de una nueva molécula de C3b a las C3-convertasas de las VC y VA genera las C5-convertasas C4b2aC3b y C3bBbC3b. Estos enzimas pasan a reconocer C5 como sustrato preferente y lo digieren en dos fragmentos C5a y C5b; el menor, C5a, se libera al medio como anafilatoxina quimiotáctica, mientras el C5b forma el primer eslabón de la cascada citolítica (C5b-C9) que lleva a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). El MAC se ensambla a través de una secuencia de interacciones no covalentes que llegan a formar canales transmembrana por los que fluyen los solutos que originan la lisis osmótica de la célula (Figura 1.8).



**Figura 1.8. Complejo de ataque a la membrana (MAC).** El C9 polimerizado forma una estructura tubular transmembrana. (<http://www.drscope.com/privados/pac/generales/inmunopatologia>).

Además de la actividad lítica existen otros mecanismos fisiológicos en los que participa el complemento, menos estudiados pero no por ello menos importantes para la protección y homeostasis del organismo. Es el caso del fenómeno de IA mediante el cual, a través de receptores celulares presentes en los eritrocitos de primates y en las plaquetas de mamíferos no primates, tiene lugar el aclaramiento de ICs, células dañadas y microorganismos opsonizados. Todo ello en cooperación con las células del sistema fagocítico (25)(26).

### **1.3.3. - Reacción de IA**

El fenómeno de IA se define como "la fijación de antígenos particulados opsonizados por anticuerpos y complemento a la superficie de eritrocitos de primates o de plaquetas de mamíferos no primates" (25). Esta reacción conduce a un notable aumento de la fagocitosis de los agentes opsonizados, por lo que se la puede considerar un mecanismo potenciador de la resistencia natural del hospedador frente a agentes infectantes (23). Las funciones fisiológicas del fenómeno de IA son diversas. En su origen fue, probablemente, un proceso opsonizante promotor de la fagocitosis que en mamíferos devino en mecanismo protector y homeostático (17). Una de las principales funciones de la IA consiste en la eliminación de ICs, agentes particulados y células senescentes del torrente sanguíneo, evitando su deposición en tejidos y articulaciones que den origen a procesos inflamatorios y autoinmunes (27). Entre las varias funciones adscritas al fenómeno de IA están el transporte de ICs a las células foliculares dendríticas de los centros germinales, lo que contribuye a mantener viva la memoria inmunológica; estimular los mecanismos innatos de la fagocitosis; limitar la activación masiva de las células fagocíticas por ICs circulantes, y, procesar los fragmentos C3b y C3bi en C3d y C3dg. Esta reacción mediada por el receptor CR1 y el cofactor I, genera complejos antígeno-C3dg que al unirse al receptor CR2 del linfocito B disparan la presentación antigénica y actúan como un potente adyuvante natural de la respuesta inmune (28).

En los primates, la reacción de IA se produce al fijarse el agente opsonizado a la superficie del eritrocito a través del receptor CR1 (CD35) que une el fragmento C3b del complemento. El CR1 es una glucoproteína monomérica de Mr ~ 200.000, perteneciente a una familia de proteínas reguladoras de la activación del complemento (RCA) codificadas en

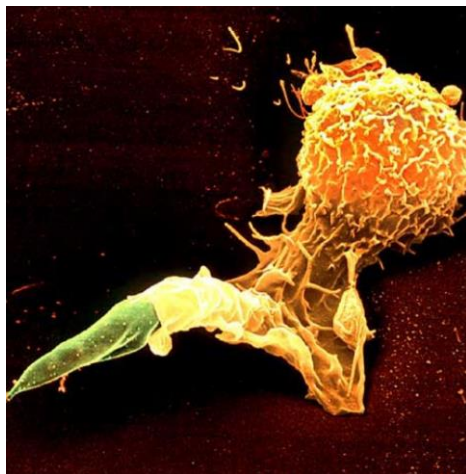
el cromosoma 1. Todas las células sanguíneas excepto las plaquetas, las células NK y la mayoría de los linfocitos T, expresan CR1. En otros tejidos el CR1 se expresa en las células foliculares dendríticas, los podocitos glomerulares y los astrocitos (29). En los eritrocitos de primates el CR1 funciona como receptor de IA fijando ICs opsonizados por C3b y/o C4b para su transporte al hígado y bazo donde son eliminados. El CR1 une también C1q (30)(31) y MBL (31), lo que sugiere que ambos ligandos intervienen en el aclaramiento de antígenos por IA. El eritrocito humano expresa alrededor de 250-500 moléculas de CR1/célula, un número claramente inferior (entre 25 y 80 veces) al que expresan los neutrófilos y monocitos en la sangre. Sin embargo, la relación eritrocito/leucocito en la sangre es de ~ 600:1, lo que hace que el ~ 90% de los receptores CR1 esté presente en los eritrocitos (32).

En mamíferos no primates la célula aceptora que desempeña el papel del eritrocito en la reacción de IA es la plaqueta (25). En el transcurso evolutivo de aves a mamíferos no primates se produjo un cambio en la expresión tisular del receptor de IA que alteró el mecanismo de la reacción. En las aves, las funciones hemostáticas, fagocítica y, presumiblemente de IA, las llevan a cabo células fagocíticas como los trombocitos y las células heterófilas de la sangre. En los mamíferos no primates la fagocitosis corre a cargo de neutrófilos y fagocitos mononucleares, mientras que las plaquetas se encargan de la hemostasis y la IA. Por último en los primates, la actividad hemostática es función de las plaquetas mientras que la IA lo es de los eritrocitos (17). La naturaleza molecular del receptor plaquetario permanece incierta (33).

#### **1.3.4.- Interacción del promastigote infectante con las células fagocíticas de la sangre**

En la infección de la sangre por *Leishmania*, tras la formación del complejo de IA el promastigote se transfiere principalmente a las células mieloides del hematoma: granulocitos y monocitos (34-36); también están presentes en el hematoma células dendríticas (CDs), células NK y linfocitos (T y B) que son, igualmente, potenciales célulasceptoras de los promastigotes. Las células CD son presentadoras profesionales de antígeno que juegan un papel fundamental en la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa (37). Constituyen una población heterogénea que deriva de un precursor

clonogénico común residente en la médula ósea **(38)**. En la sangre, su frecuencia es muy baja (0,2-0,8 %), y por ella circulan al menos tres subpoblaciones precursoras en viaje a tejidos y órganos linfáticos: las CD plasmacitoides (pCDs), las CDs mieloides (mCDs), y una tercera población minoritaria caracterizada por expresar la molécula CD209 (DC-Sign) que co-expresa CD14, CD16 y CD33 **(18)**. Se ha publicado que esta subpoblación juega un papel en la transmisión del virus VIH-1 y una promastigotes en la infección por *Leishmania* **(39)** por lo que será objeto de nuestro análisis. Una subpoblación de las mCDs migra a la epidermis donde recibe el nombre de células de Langerhans igualmente implicadas en la leishmaniosis cutánea **(18)**.



**Figura 1.9. Interacción de *Leishmania* con células fagocíticas.** Macrófago fagocitando un promastigote de *L.mexicana* (imagen de J. Berger)  
(<http://www.sfgate.com/science/article/Compassionate-parasite-Microscopic-creatures-2928660.php>).

La infección de los fagocitos por *Leishmania* se inicia con la adherencia del parásito a receptores específicos de la superficie celular y su posterior interiorización a través de la vacuola endocítica en el fagolisosoma. El proceso de adherencia del promastigote a la superficie celular es saturable, específico e inhibible competitivamente. En ausencia de opsonización por suero, se han descrito diversos ligandos del parásito que mediatizan la interacción con la célula aceptora: el lipofosfoglucono **(40)**, la metaloproteinasa gp63 **(41)**, el ligando para el receptor de fucosa-manosa **(42)**, etc. No obstante, en condiciones fisiológicas *Leishmania* se encuentra opsonizada y su interiorización se produce por fagocitosis mediada por AcN y por los componentes del complemento **(43)**. Se ha descrito igualmente, la participación de otras opsoninas como la MBL y la Proteína C reactiva en el mecanismo de infección **(44)**. Los promastigotes opsonizados por complemento se unen principalmente a los receptores CR1 y CR3 y probablemente a los receptores FcγR de

neutrófilos y monocitos **(45-48)**, interiorizándose en la célula diana a través de un proceso endocítico en cremallera ("zipper") o mediante caveolae **(49)**; tras la fusión del fagosoma con endosomas y lisosomas citosólicos, se forma el fagolisosoma acidófilo donde reside y se multiplica el parásito.

Estudios pioneros con promastigotes de *L. donovani* opsonizados con suero humano indican que la lisis de los promastigotes es dependiente de la presencia de anticuerpos y ocurre a través de la vía clásica del complemento (2). Análogamente se observó que la opsonización de promastigotes de *L. donovani* con concentraciones subaglutinantes de suero inmune anti*Leishmania* potenciaba la unión del parásito a macrófagos de cricétidos **(50)**. Más recientemente se ha confirmado, que los receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas participan en la interiorización del promastigote **(48)(51)**. Por ejemplo, el papel de receptores FcR en la penetración de amastigotes de *L. major* en macrófagos de ratón **(46)**, y de amastigotes de *L. mexicana* en células COS transfectadas con FcγRIIb **(52)** está bien documentado. La infección con *L. amazonensis* o *L. pifanoi* de ratones que carecen de anticuerpos circulantes anti*Leishmania* o de la cadena y del receptor FcR (cadena común a los tres receptores: FcγRI, FcεRI y FcγRIII), sigue un curso más lento y limitado en dichos animales que en los de la cepa normal **(48)**, lo que indica que los anticuerpos y los receptores FcγR juegan un papel relevante en la patogenia y desarrollo de la enfermedad. La interacción de anticuerpos anti*Leishmania* con el parásito forma ICs que potencian la invasión del macrófago a través de los receptores FcγR **(46)(48)(53)**. Este mecanismo induce un cambio en el patrón de las linfocinas proinflamatorias secretadas por los macrófagos que pasan de ser IL-1 e IFNγ a IL-4 e IL-10 **(54)**; de este modo se genera un nuevo microambiente que induce respuestas Th2 que potencian el progreso de la enfermedad **(51)(55)**.

Los receptores celulares que han sido mayoritariamente involucrados en la unión de los promastigotes opsonizados a los leucocitos son los receptores CR1 y CR3 para los fragmentos C3b y C3bi del complemento **(45)(47)(56)(57)**. El CR1 está presente en la totalidad de células sanguíneas a excepción de las plaquetas, las células NK y la mayoría de los linfocitos T **(58)**; su expresión cuantitativa fluctúa entre 20.000 y 40.000 receptores/célula, y al igual que el CR3, su número depende del estado fisiológico de la célula **(57)**. En tejidos no sanguíneos, el CR1 se expresa en las células foliculares dendríticas, podocitos glomerulares y astrocitos **(29)**. El CR3 (Mac-1, CD11b/CD18) es una molécula heterodimérica de la familia β2 de integrinas. Se expresa en la membrana de



granulocitos y de la mayoría de los fagocitos mononucleares y células NK (58). Es un receptor versátil que además de ser el principal receptor de promastigotes opsonizados por C3bi (47) está también involucrado en la adherencia celular a través de ICAM-1 a células endoteliales activadas (59), la fijación del factor X de coagulación, el fibrinógeno y oligodeoxinucleótidos. Además, posee un dominio tipo lectina capaz de unir polisacáridos complejos como  $\beta$ -glucano, LPS y los zimosanos de la pared de levaduras (58). Los macrófagos de mamíferos expresan también receptores de naturaleza lectina tipo C con amplio espectro de reconocimiento y función de "barrendero" ("scavenger"). Es el caso del receptor de manosa, pero éste no parece desempeñar un papel sustancial en la defensa frente a *Leishmania* (42).

Abundantes datos experimentales indican que la infección de *Leishmania* altera profundamente a la actividad fagocítica de la célula retardando la maduración de los lisosomas, modifica el metabolismo oxidativo (estallido respiratorio y óxido nítrico) y aumenta la liberación de enzimas hidrolíticos que afectan a la supervivencia del parásito. La invasión celular por *Leishmania* requiere la previa opsonización del parásito por el complemento ya que es el componente C3b el que promueve la interacción promastigote-célula. Está descrito que los promastigotes opsonizados con C3 muestran mayor supervivencia post-infección en los macrófagos de ratón (60) y que la invasión de monocitos y granulocitos humanos por parásitos opsonizados por C3 a través de CR1 y CR3 transcurre de manera "silenciosa" sin activación celular (61).

Por otra parte, la infección de macrófagos con amastigotes de *Leishmania* inhibe numerosas funciones metabólicas, y en un análisis de 245 genes el 37% se vio que estaba, al menos, parcialmente reprimido (62). En macrófagos infectados por *Leishmania* la actividad proteína quinasa C (PKC) esta inhibida; este enzima es responsable de activar el estallido respiratorio y su bloqueo impide la formación de metabolitos reactivos del oxígeno: anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que son altamente tóxicos para *Leishmania* (63). La infección de macrófagos por *L. donovani* inhibe la actividad fosforilante de la PTK y la expresión IFN $\gamma$  citocina responsable de la inducción de iNOS (64), enzima que cataliza la síntesis de óxido nítrico (NO), altamente citocida para el amastigote (65).

La fagocitosis de células bacterianas por los macrófagos estimula la síntesis de una variedad de citocinas que disparan las respuestas inmunitarias innata y adaptativa del hospedador (66). En contraste, la infección *in vitro* de macrófagos por *Leishmania spp*

inhibe la biosíntesis de IL-12 y suprime la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) que reclutan a las células fagocíticas (granulocitos y monocitos/macrófagos) al punto de la infección. La IL-12 juega un papel fundamental en la activación de los linfocitos Th-1, ya que promueve la secreción del INF $\gamma$  que activa la respuesta microbicida de los macrófagos (67). No obstante lo anterior, datos obtenidos *in vivo* en el ratón indican que en las etapas tempranas de la infección por *L. donovani* y *L. major* se inducen citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) (68).

La infección por *Leishmania* activa en los macrófagos la secreción y un aumento de la actividad de diversas linfocinas de carácter inmunosupresor (IL-10, TGF- $\beta$ ) y de metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandina E2) que modulan la respuesta inmunitaria del hospedador. TGF- $\beta$  es una potente citocina inmunosupresora que afecta al desarrollo de los linfocitos Th-1 y Th-2, retarda la expresión del enzima iNOS y disminuye la actividad de las células NK y la producción de IFN $\gamma$ . En el ratón, la presencia de TGF- $\beta$  fomenta la infección y la evasión del parásito (69). En macrófagos humanos infectados *in vitro* con *L. chagasi*, se observa un aumento de la concentración de TGF- $\beta$  activo en el microambiente celular, lo que redunda positivamente en la supervivencia del parásito (70).

IL-10 es una citocina antiinflamatoria secretada por los macrófagos infectados por *Leishmania* que constituye un importante factor de virulencia en las leishmaniosis. IL-10 convierte al macrófago en refractario a la activación por IFN  $\gamma$  lo que suprime su acción microbicida; igualmente, además de inhibir el desarrollo de células Th-1 e induce respuestas Th-2 no protectoras (54). Se ha visto que ratones transgénicos que expresan constitutivamente IL-10 no controlan la infección por *Leishmania* (71), y que el uso de AcM anti-IL-10R (receptor de IL-10) en ratones infectados estimula la formación de granulomas que promueven la eliminación del parásito (72). Como se indicó anteriormente, la unión de ICs de amastigotes y anticuerpos anti*Leishmania* a los receptores FcR de macrófagos bloquea la transcripción de IL-12, lo que genera altos niveles de IL-10 y suprime la respuesta inmunitaria (73)(74).

## **2.- OBJETIVOS**



El proyecto que aborda esta tesis tiene como fin profundizar en el análisis del mecanismo de infección ex vivo de sangre humana por promastigotes de *Leishmania*. Se parte del supuesto que la infección natural ocurre en el hematoma dérmico originado por el flebótomo durante la ingesta de sangre. El flebótomo inocula promastigotes bien directamente en el hematoma o bien en el espacio intersticial de la dermis. En ambos casos los promastigotes se enfrentan al microambiente en el que están presentes el suero y por tanto, el complemento y los anticuerpos, los dos componentes opsonizantes por excelencia. En esta tesis hemos utilizado la infección de sangre humana fresca como modelo experimental que reproduce cercanamente la situación fisiológica existente en el hematoma dérmico y ello con el propósito de identificar la secuencia de interacciones celulares que experimenta el parásito tras su inoculación.

Recientemente se ha descrito que uno de los mecanismos que mediatizan el contacto inicial de los promastigotes con sangre humana es la reacción de IA. Consecuentemente, hemos intentado profundizar en el análisis de los aspectos cinéticos del mecanismo de IA y dilucidar cómo dicha estrategia permite al parásito sortear la barrera citocida del complemento. Por otra parte, *Leishmania* es un parásito intracelular que precisa alojarse en una población permisiva al abrigo de la respuesta citotóxica del hospedador. Durante la primoinfección, el promastigote se enfrenta a distintas poblaciones celulares de la sangre: granulocitos, monocitos, linfocitos T y B, células NK y células dendríticas de fenotipo CD209-Sign. Por consiguiente, hemos analizado la interacción del promastigote con dichas poblaciones y el papel de los receptores celulares en el tropismo del parásito.

Se ha descrito que la infección del promastigote es un proceso silente. Hemos considerado oportuno contrastar este aserto en nuestro modelo de infección de sangre humana midiendo el desencadenamiento del estallido respiratorio de los leucocitos y, paralelamente, analizar la expresión de citocinas inmunorreguladoras por las células infectadas.

### **3.- MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1-REACTIVOS Y MATERIALES

5-clorometil fluoresceína di-acetato (CMFDA), Molecular Probes

Ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA), Sigma.

Anticuerpo Monoclonal anti CD14-APC, BD

Anticuerpo Monoclonal anti CD15-PE, BD

Anticuerpo Monoclonal anti CD3-Cy-cromo, BD

Anticuerpo Monoclonal anti CD19-APC, Biolegend

Anticuerpo Monoclonal anti CD56-APC, BD

Anticuerpo Monoclonal anti CD209-PE, eBioscience

Anticuerpo Monoclonal anti CD16, Serotec

Anticuerpo Monoclonal anti CD32, Serotec

Anticuerpo Monoclonal anti IFN- $\gamma$  -PE, BD

Anticuerpo Monoclonal anti TNF- $\alpha$  -PE, BD

Anticuerpo Monoclonal anti IL4-PE, BD

Anticuerpo Monoclonal anti IL12-PE, BD

Anticuerpo Monoclonal anti IL10-PE, BD

Anticuerpo Monoclonal anti TGF- $\beta$ 1-PE, R&D Systems

Azul de tripano, Merck.

Carboxi -H<sub>2</sub> 2',7' -diclorofluoresceína diacetato (DCFDA), Molecular Probes

Cloruro de Magnesio, Merk.

Ester de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), Sigma.

Glutamina, Sigma.

Heparina sódica al 5% (5.000 U.I./ml), Orbi.

Isotiocianato de fluoresceína, Sigma

Medio RPMI 1640, Gibco.

Paraformaldehido (PCHO) al 2%,

Penicilina (20.000 U.I./ml) - Estreptomicina (20.000 U.I./ml), Bio Whittaker.

Percoll (densidad= 1.130), Pharmacia.

Solución de lisis, DAKO.

Solución permeabilizante, Becton Dickinson.

Solución de fijación/permeabilización Intrastain, DAKO.

Suero bovino fetal, Imperial Lab.

Tubos de vidrio para separación de suero, Becton Dickinson.

Tripsina (Merck)

Yoduro de propidio, Sigma

### 3.2. PROTOZOOS

Se utilizaron tripanosomátidos del género *Leishmania*.

<u>Especie</u>	<u>Aislado</u>	<u>Designación Internacional</u>
<i>L. amazonensis</i>	María	MHOM/Br/79/María
<i>L. infantum</i>	10445	MCAN/ES/97/10.445

#### 3.2.1. Cultivo de promastigotes

Los parásitos se cultivaron en la forma promastigote a 27 °C en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% (inactivado tras incubación a 56°C durante 30 minutos), glutamina (2mM), penicilina (100 U.I./ml) y estreptomicina (100 µg/ml). En adelante, este medio recibe la denominación de "medio completo". Al alcanzar los cultivos la fase de crecimiento estacionario, se decantaba el medio utilizado y se reiniciaban añadiéndoles medio completo.

Los cultivos se iniciaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  promastigotes/ml, diariamente se tomaron muestras por duplicado, y tras fijarlas con solución de formaldehído al 1%, se determinó el número de parásitos en cámara de Neubauer. Los recuentos se realizaron hasta que el cultivo alcanzó la fase de crecimiento estacionario.

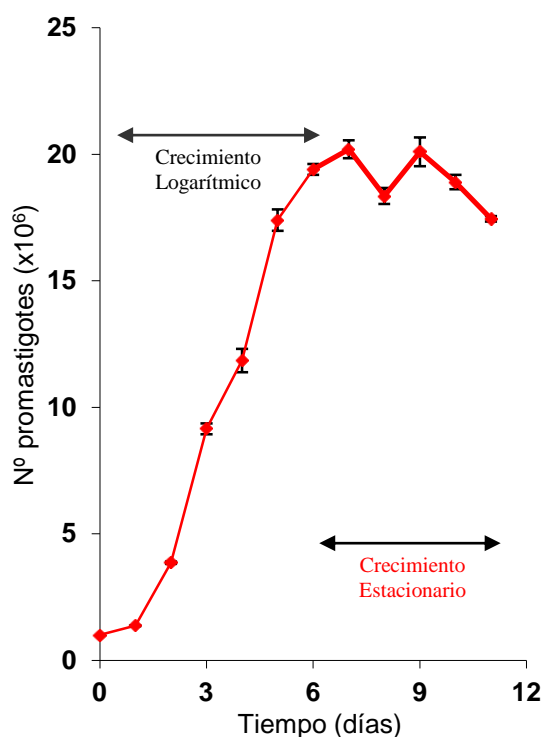


Figura 3.1. Curva de crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis*. Los promastigotes utilizados en el estudio corresponden al tramo de la curva marcado como crecimiento estacionario.



La Figura 3.1 muestra la curva de crecimiento de *L. amazonensis*. En ella se distinguen dos regiones, una en la que los promastigotes crecen activamente denominada fase de crecimiento exponencial o logarítmico (promastigotes logarítmicos), y la segunda en la que cesa su multiplicación: fase de crecimiento estacionario (promastigotes metacíclicos). Utilizaremos promastigotes de la fase estacionaria en los experimentos, salvo cuando se indique lo contrario. La concentración celular en esta región es del orden de  $2 \times 10^7$  células/ml.

### 3.2.2 Marcaje de los promastigotes

a) Marcaje con CMFDA: el marcaje se llevó a cabo con CMFDA siguiendo el protocolo suministrado por la empresa Molecular Probes (con modificaciones). Los promastigotes de *L. amazonensis* o *L. infantum* se lavaron dos veces por centrifugación ( $1.000 \times g$ , 15 minutos,  $20^\circ\text{C}$ ) en tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM pH 7,2 (PBS). El sedimento celular se resuspendió en PBS a la concentración de  $10^7$  promastigotes/ml y se le añadió CMFDA a la concentración final de  $3 \mu\text{M}$ , incubándose durante 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrido el tiempo, los promastigotes se lavaron dos veces por centrifugación ( $11.000 \times g$ , 1 minuto) y se ajustaron en PBS a la concentración inicial. Para medir la fluorescencia emitida por los parásitos marcados se utilizó un citómetro de flujo FACScalibur (BD) y el programa informático CELLQuest suministrado con el equipo. Los promastigotes-CMFDA, presentaban una población marcada homogéneamente con una emisión en el detector de FL-1 (530 nm) de intensidad media de fluorescencia entre  $10^2$  y  $10^3$  unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). Los promastigotes-CMFDA se observan en el microscopio de fluorescencia teñidos con una coloración verde brillante (Figura 3.2). Antes de usar los parásitos así marcados y dado que se utilizarán en experimentos donde entran en contacto con el suero del hospedador, se comprobó que el complemento no afectaba a la emisión de fluorescencia de los promastigotes.

b) Marcaje con el anticuerpo monoclonal (AcM) SIM 6-11.2.1: promastigotes de *L. amazonensis* ( $2 \times 10^7$ ) se sedimentaron por centrifugación ( $11000 \times g$ , durante 1 minuto). Una vez retirado el sobrenadante, el sedimento de parásitos se incubó con un AcM que reconoce la glicoproteína gp46 de *L. amazonensis* conjugado a isotiocianato de fluoresceína (SIM 6-11.2.1-FITC). La incubación se llevó a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ) durante 60 minutos. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS por centrifugación ( $11.000 \times g$ , 1 min), y, finalmente, se resuspendieron a la concentración de  $10^8/\text{ml}$ . La imagen de los promastigotes marcados que se observa en el microscopio de fluorescencia es similar a la obtenida cuando se utiliza CMFDA (Figura 3.2).

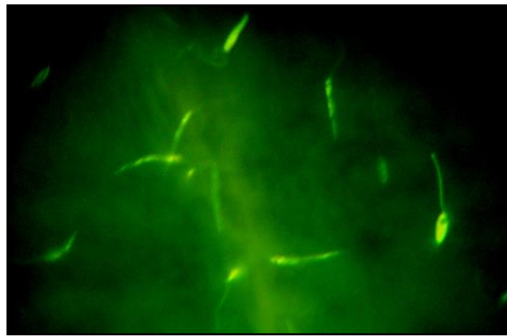


Figura 3.2. Imagen al microscopio de fluorescencia de promastigotes de *L. amazonensis* marcados con CMFDA.

### **3.3- PROCEDENCIA Y OBTENCIÓN DE LAS SANGRES**

Las sangres utilizadas procedían de individuos adultos sanos de humanos (*Homo sapiens*), ratones (*Mus musculus*) y conejos (*Oryctolagus cuniculus*). Las muestras se extrajeron por venopunción, excepto las de ratón que se obtuvieron del plexo retroorbital.

La sangre extraída se recogió con heparina (10 U.I./ml de sangre). Los animales utilizados procedían del animalario del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

#### **3.3.1.- Obtención de sueros**

La sangre recolectada en tubos de vidrio sin heparina se dejó coagular a 20 °C durante 30 minutos. Una vez formado el coágulo los tubos se centrifugaron a 1200 x g durante 10 minutos. El suero obtenido se repartió en alícuotas conservándose a -80 °C hasta el momento de su utilización.

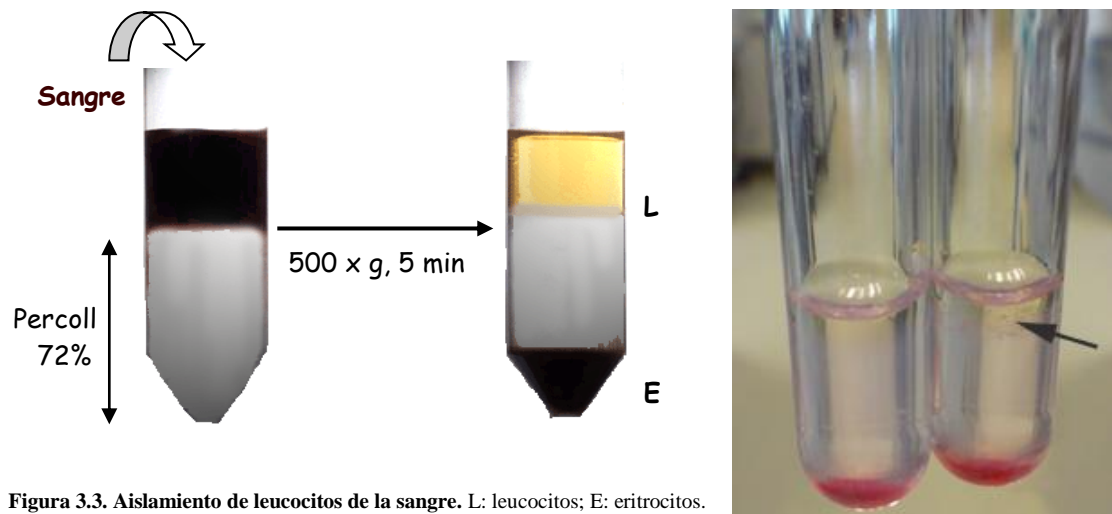
#### **3.3.2.- Aislamiento de eritrocitos**

La sangre heparinizada se diluyó al 50% con PBS y se centrifugó (500 x g, 5 minutos) a temperatura ambiente (20 °C). La capa de leucocitos ("buffy coat") depositada sobre el sedimento de eritrocitos se desechó; los eritrocitos se resuspendieron en PBS, repitiéndose el lavado por centrifugación un total de tres veces. Tras cada centrifugación, un diez por ciento, aproximadamente, de la parte superior del sedimento de eritrocitos se descartaba. Finalmente, los eritrocitos se resuspendieron en PBS a la concentración deseada.

#### **3.3.3.- Aislamiento de leucocitos**

La población total de leucocitos se aisló centrifugando (500 x g, 5 minutos) una muestra de sangre completa diluida al 50% con PBS a través de una solución de Percoll al

72%. Tras la centrifugación, los leucocitos se localizan en la interfase superior (plasma-Percoll), mientras que los eritrocitos atraviesan la solución de Percoll y se depositan en el fondo del tubo (Figura 3.3). Los leucocitos de la interfase se diluyeron en 10 volúmenes de PBS y se centrifugaron ( $500 \times g$ , 5 minutos) para eliminar restos de Percoll. Finalmente, el sedimento celular se resuspendió en PBS a la concentración deseada.

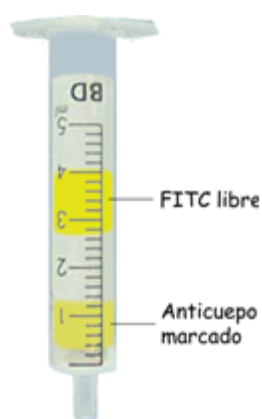


#### 3.3.4.- Preparación de sangre humana reconstituida

Para reconstituir una muestra de sangre los componentes se mezclaron en la proporción en la que se encuentran en la sangre normal. La proporción que ocupa el suero en la sangre se determinó midiendo el volumen de suero obtenido tras centrifugar 1 ml de sangre heparinizada a  $1.200 \times g$  durante 10 minutos. Para determinar el número de eritrocitos y leucocitos en la sangre se aislaron ambas fracciones celulares según se acaba de describir en los apartados anteriores, y su número se determinó por conteo en cámara de Neubauer.

### 3.4.- ANTICUERPOS MONOCLONALES

En este trabajo se empleó el AcM obtenidos en nuestro laboratorio: SIM 6-11.2.1 (IgG2a) que reconoce la glucoproteína gp46 de *L. amazonensis*. El AcM se purificó a partir de sobrenadante del cultivo del hibridoma por inmunoabsorción en columna de Proteína G-Shepharosa (Amersham Biosciences). Los anticuerpos se eluyeron con 0,1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ . La concentración de los anticuerpos se determinó midiendo la densidad óptica de la solución a la longitud de onda de 280 nm. Como coeficiente de extinción porcentual ( $E\%_{280}$ ) de la IgG de ratón se tomó  $1.4 A_{280} = 1 \text{ mg/ml}$ . Una vez purificado una alícuota de la preparación a una concentración de 1 mg/ml, se marcó con Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Brevemente, al AcM SIM 6-11.2.1 dializado frente a 0,1 M de  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_3\text{Na}_2$  pH 9.3, se le añadió 100  $\mu\text{l}$  de FITC (1 mg/ml en DMSO). La mezcla se incubó con agitación durante 2 horas en la oscuridad, y tras la reacción se filtró a través de una columna de Sephadex G-25 (5 ml) para separar el SIM 6-11.2.1-FITC del fluorocromo libre que no ha reaccionado (Figura 3.4). La actividad del conjugado se determinó por citometría o por inmunofluorescencia.



**Figura 3.4.** Purificación de un AcM conjugado con FITC.

### **3.5.-INTERACCIÓN DE LOS PROMASTIGOTES CON CÉLULAS DE LA SANGRE HUMANA**

#### **3.5.1. - Interacción con eritrocitos**

##### **3.5.1.1-Formación del complejo de IA**

Para visualizar los complejos de IA formados se incubaron 50  $\mu$ l de sangre completa humana con 50  $\mu$ l de una suspensión de  $10^8$  promastigotes/ml durante 2 minutos a 37 °C. Finalizada la incubación, una alícuota de 50  $\mu$ l se transfirió a un pocillo de fondo plano de una placa de 96 pocillos que contenía el mismo volumen de PBS y se realizaron diluciones seriadas de 1/2. Tras un corto intervalo de tiempo para permitir la sedimentación de las células, la preparación se observó en un microscopio óptico de luz invertida. Como control negativo se utilizó sangre pretratada con 10 mM EDTA que inhibe la acción del sistema del complemento.

##### **3.5.1.2.-Cinética de formación del complejo de IA**

Para caracterizar la cinética de formación del complejo de IA entre el promastigote y los eritrocitos humanos se incubaron (37 °C, 0-300 segundos)  $10^7$  promastigotes de *L. amazonensis* o de *L. infantum* marcados con CMFDA, con 25  $\mu$ l de suero humano normal (SHN) y 40  $\mu$ l de eritrocitos humanos al 100% (v/v) ( $4 \times 10^8$  células), en un volumen final de 100  $\mu$ l en PBS. La reacción se detuvo añadiendo 10 mM EDTA. A continuación, las muestras se depositaron sobre 10 volúmenes de una solución de Percoll al 72%, centrifugándose durante 5 minutos a 500 x g. El contenido de cada uno de los tubos se recogió en dos fracciones: 1) el sedimento de eritrocitos, y 2) el resto de la solución. Ambas fracciones se lavaron dos veces con PBS por centrifugación (500 x g, 5 minutos), y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur determinándose el número total de eventos fluorescentes de cada una de las fracciones. Para cada tiempo analizado los datos se normalizaron en tanto por ciento, siendo el 100% la suma de promastigotes (eventos fluorescentes) en las dos fracciones.

### 3.5.1.3 Caracterización de la reacción de IA

#### 3.5.1.3.1.- Reacción de IA con suero y eritrocitos de distintos órdenes de vertebrados

Para caracterizar los componentes que participan en la reacción de IA se realizó un ensayo de reactividad cruzada empleando suero y eritrocitos de tres especies de vertebrados: humano, ratón y conejo. La cinética de formación del complejo de IA se realizó incubando (37 °C, 0-240 segundos)  $10^7$  promastigotes de *L. amazonensis* marcados con CMFDA en un volumen final de 100  $\mu$ l, con suero y eritrocitos de las tres especies de vertebrados. Se realizaron nueve mezclas de reacción (Tabla 1).

	Promastigotes ( $10^7$ )	Suero (al 25%)			Eritrocitos ( $4 \times 10^8$ )		
	<i>L. amazonensis</i>	Humano	Ratón	Conejo	Humano	Ratón	Conejo
1	+	+			+		
2	+		+		+		
3	+			+	+		
4	+	+				+	
5	+		+			+	
6	+			+		+	
7	+	+					+
8	+		+				+
9	+			+			+

**Tabla 1.** Combinaciones de promastigotes, suero y eritrocitos realizadas para caracterizar la reacción de IA.

Finalizada la incubación la reacción se paró añadiendo 10  $\mu$ l de EDTA 0,1 M. A continuación, las muestras se depositaron sobre 10 volúmenes de una solución de Percoll al 72%, centrifugándose durante 5 minutos a 500 x g. El contenido de cada tubo se recogió en dos fracciones: el sedimento de eritrocitos, y el resto de la solución. Ambas fracciones

se lavaron dos veces por centrifugación (500 x g, 5 minutos) en PBS, y se analizaron en el citómetro de flujo (Materiales y métodos 3.5.1.2). Los complejos de IA formados se visualizaron en un microscopio óptico de luz invertida; para ello se prepararon las nueve mezclas de reacción descritas en el ensayo anterior y se incubaron con  $5 \times 10^6$  promastigotes de *L. amazonensis*, en un volumen final de 100  $\mu$ l, durante 2 minutos a 37 °C. Al final de la incubación las muestras se trataron como se describe en el apartado de materiales y métodos 3.5.1.1.

### **3.5.1.3.2.-Cinéticas de lisis de promastigotes en presencia o ausencia de eritrocitos**

Se utilizaron tres mezclas de reacción: en la primera se incubaron (37 °C) 50  $\mu$ l de promastigotes de *L. amazonensis* marcados con CMFDA ( $10^7$  parásitos/ml) con 50  $\mu$ l de eritrocitos humanos ( $10^9$  células/ml), 3,5  $\mu$ l de yoduro de propidio (YP) (1mg/ml) y 100  $\mu$ l de suero humano normal (SHN) en un volumen final de 200  $\mu$ l. En la segunda, se sustituyó el volumen de eritrocitos por PBS, y como control del ensayo se utilizó una tercera mezcla, igual a la primera, conteniendo 10 mM EDTA.

Inmediatamente después de la preparación de las mezclas se realizó una adquisición en tiempo real en el citómetro de flujo midiendo el porcentaje de promastigotes que incorporaban YP durante 4 minutos.



### **3.5.2.- Interacción con Leucocitos**

#### **3.5.2.1-Análisis de la estabilidad del complejo de IA en presencia o ausencia de poblaciones leucocitarias**

Una muestra de sangre heparinizada se repartió en dos alícuotas. Una de ellas (control) se reservó a 20 °C hasta el momento del uso. De la segunda se eliminaron los leucocitos por centrifugación a través de una solución de Percoll al 72% (500 x g, 5 minutos). El sedimento de eritrocitos se lavó dos veces por centrifugación (500 x g, 5 minutos) en PBS, y se resuspendió en un volumen de plasma de modo que la concentración de eritrocitos en la preparación fuera similar a la de la sangre control.

La reacción de IA se llevó a cabo con ambas alícuotas. Se mezclaron 50µl de promastigotes ( $10^7$ /ml) marcados con CMFDA con 100 µl de sangre normal o de sangre a la que se habían eliminado los leucocitos, y se incubaron a 37 °C durante distintos tiempos (0-10 minutos). Finalizada la incubación las muestras se centrifugaron a través de 1 ml de Percoll al 72% (500 x g, 5 min). Las fracciones correspondientes a la zona superior del gradiente y al sedimento se recogieron por aspiración y se procesaron por citometría de flujo como se detalla en el apartado de Materiales y métodos 3.5.1.2.

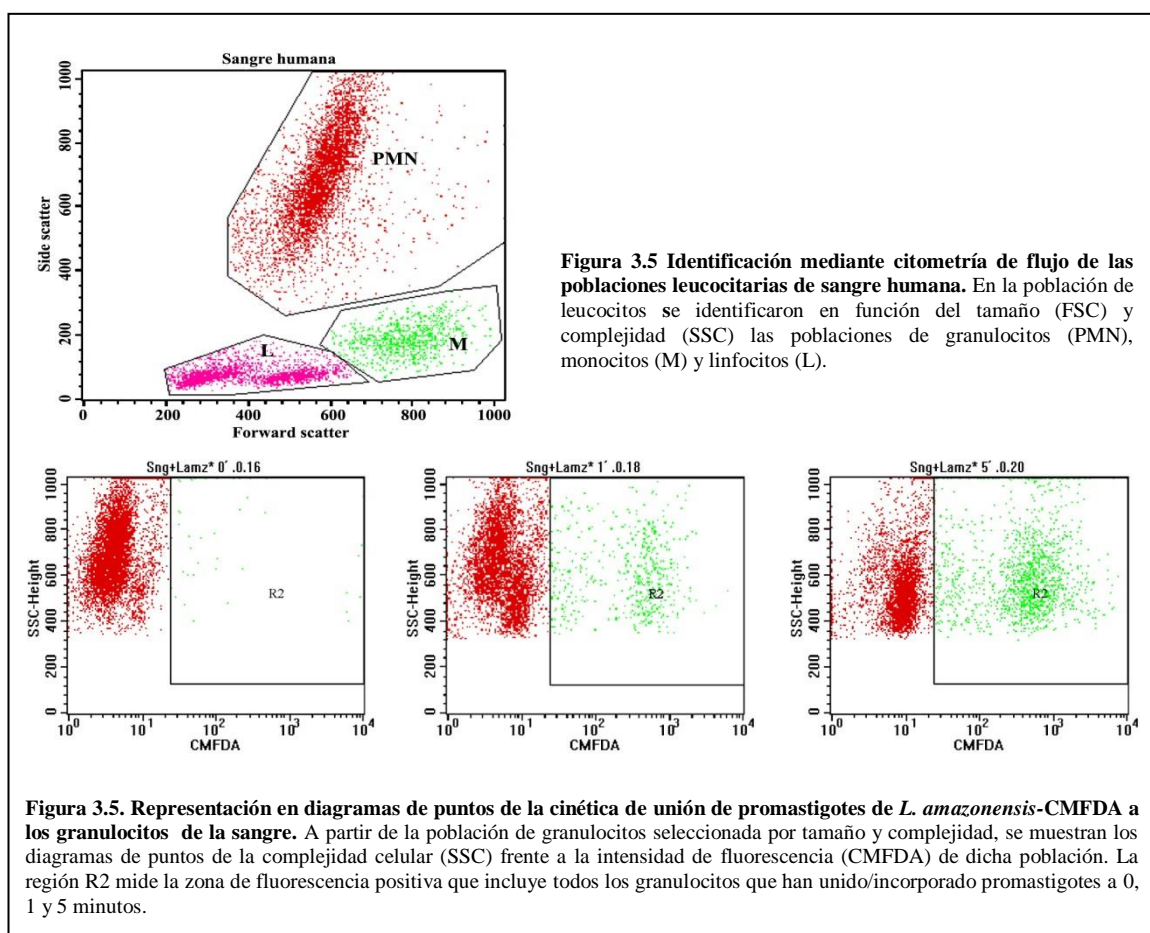
#### **3.5.2.2.- Caracterización de las poblaciones leucocitarias aceptoras de promastigotes en sangre.**

Un mililitro de sangre humana heparinizada se incubó con 1 ml de promastigotes ( $10^7$ /ml) de *L. amazonensis* marcados con CMFDA. La infección *ex vivo* se realizó a 37 °C durante 5 min. Transcurrido el tiempo de incubación la sangre se dividió en alícuotas de 200 µl. En cada alícuota se lisaron los eritrocitos (10 minutos, 20 °C) utilizando 2 ml de la solución de lisis (BD). Las células se lavaron con PBS, por centrifugación (500 x g 10 min) y a cada alícuota se le añadió uno de los siguientes AcM específicos de leucocitos humanos: CD14 APC (BD), CD15 PE (BD), CD3 Cy-cromo (BD), CD19 APC (BioLegend), CD56 APC (BD) y CD209 PE (eBioscience). Las muestras se incubaron durante 30 minutos, se lavaron con PBS por centrifugación (500 x g, 10min), y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur. En cada una de las poblaciones leucocitarias se analizó el porcentaje de células que habían unido promastigotes (eventos positivos en FL1).

### 3.5.2.3. Cinética de unión de promastigotes a granulocitos y monocitos en sangre.

Se añadieron 50 $\mu$ l de promastigotes ( $10^7$ /ml) de *L. amazonensis* marcados con CMFDA sobre 50  $\mu$ l de sangre humana heparinizada, incubándose (37 °C) durante distintos tiempos. La reacción se detuvo añadiendo 2ml de solución de lisis (BD), y transcurridos 10 minutos las células se lavaron por centrifugación (500 x g, 5 min.) dos veces con PBS. La población de leucocitos o de las subpoblaciones de granulocitos y monocitos se seleccionó en un gráfico de tamaño de célula (FSC) frente a su complejidad (SSC). El porcentaje de granulocitos que unían promastigotes se determinó en un segundo gráfico de SSC frente a FL1, pero en este caso referido únicamente a la población de granulocitos seleccionada previamente por FSC/SSC. Para cada tiempo de medida se determinó el porcentaje de células positivas en FL1.

Un análisis similar se hizo para cuantificar el porcentaje de monocitos que unían promastigotes. En este caso, la población seleccionada en el gráfico FSC/SSC fue la de monocitos, por lo que el gráfico SSC/FL1 está referido a dicha población.



### 3.5.2.4.-Cinética de interiorización de los promastigotes en los leucocitos de la sangre

Básicamente los experimentos realizados para este fin se llevaron acabo de idéntica manera a como acabamos de describir en el apartado anterior, con la salvedad que para poder distinguir entre promastigotes totales e interiorizados fue necesario un tratamiento adicional de las muestras que describimos a continuación

#### A) Tratamiento con azul de tripano

Se incubaron a 37 °C durante distintos tiempos (0-30 min) y por duplicado, 100 µl de sangre completa con 10 µl de promastigotes ( $10^8$  células/ml) de *L.amazonensis* marcados con CMFDA. La relación célula aceptora: promastigote utilizada fue de aproximadamente 1:1. Al término de las incubaciones las muestras se diluyeron con 10 volúmenes de formaldehído al 1% y se centrifugaron (500 x g, 5 minutos). El sedimento celular de uno de los duplicados se incubó con 200 µl de azul de tripano (TB) (2 mg/ml) durante 5 minutos a 20 °C.; el segundo duplicado se trató con la misma cantidad de PBS. Acto seguido, las mezclas de reacción se lavaron dos veces por centrifugación (500 x g, 5 minutos) y el sedimento se trató con 2 ml de solución de lisis (10 minutos, 20 °C). Tras dos nuevos lavados por centrifugación (500 x g, 5 min) en PBS, el porcentaje de granulocitos y monocitos infectados a cada tiempo se determinó mediante citometría de flujo midiendo la diferencia existente en la intensidad de fluorescencia de las muestras tratadas y las no tratadas con TB.

Para contrastar los resultados obtenidos en el ensayo anterior se realizó un análisis al microscopio de fluorescencia apantallando con azul de tripano. Se incubaron (37 °C, 10 min) por duplicado, 10 µl de promastigotes ( $10^8$  células/ml) de *L. amazonensis* marcados con CMFDA con 100 µl de una mezcla compuesta de leucocitos y suero humano normal al 25% en PBS. La ratio célula aceptora: promastigote fue de ~1/1. Finalizada la incubación, uno de los duplicados se incubó con 200 µl de azul de tripano en las mismas condiciones que las descritas en el ensayo anterior, y el otro se trató con la misma cantidad de PBS. Tras un lavado por centrifugación (500 x g, 5 minutos), los sedimentos celulares se resuspendieron en PBS a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  células/ml. Alícuotas de  $5 \times 10^4$  células se sedimentaron en una citocentrífuga (Cytospin, Shandon) a 550 rpm durante 10 minutos y se observaron al microscopio de fluorescencia.

### B) Tratamiento con solución permeabilizadora

Realizamos un marcaje fluorescente de los promastigotes unidos/interiorizados a leucocitos previo tratamiento de la muestra con solución permeabilizante. En las muestras permeabilizadas el marcador se une tanto a los promastigotes libres como a los interiorizados en los fagocitos, mientras que en las muestras no permeabilizadas, la membrana celular impide que se marquen los promastigotes interiorizados.

Se incubaron 100  $\mu$ l de sangre completa con 10  $\mu$ l de promastigotes ( $10^8$ /ml) a 37 °C durante distintos tiempos (0-30 minutos). La reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml de formaldehído al 1%, y las muestras se lavaron por centrifugación en PBS (500 x g, 5 minutos). El sedimento celular se resuspendió en PBS y se dividió en dos alícuotas, una de ellas se incubó con 500  $\mu$ l de solución permeabilizadora (Becton Dickinson), durante 15 minutos a 20 °C; la otra alícuota se trató con el mismo volumen de PBS. Tras la incubación las muestras se lavaron por centrifugación (500 x g, 5 minutos) en PBS y se incubaron (20 minutos, 20 °C) en la oscuridad con el AcM SIM 6-11.2.1 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Antes de ser analizadas en el citómetro de flujo las muestras se sometieron a dos nuevos lavados por centrifugación (500 x g, 5 minutos). El análisis de las muestras se llevó a cabo midiendo la diferencia existente en la intensidad de fluorescencia de las muestras permeabilizadas y las no permeabilizadas para cada tiempo de incubación.

### C) Tratamiento con proteasas

El tratamiento con proteasas elimina el AcM SIM 6-11.2.1 de los promastigotes que se encuentran unidos externamente a las células pero no de aquellos que han sido interiorizados. Se incubaron (37 °C, 30 minutos) por duplicado, 100  $\mu$ l de sangre completa con 10  $\mu$ l de promastigotes ( $10^8$  parásitos/ml) de *L. amazonensis* marcados con el anticuerpo monoclonal SIM 6-11.2.1-FITC. Se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ l a cada tiempo medida a las que se añadieron 500  $\mu$ l de formaldehído al 1% para parar la reacción. Seguidamente, las muestras se depositaron sobre 1 ml de solución de Percoll al 72% y se centrifugaron (500 x g, 5 minutos). La nube de leucocitos resultante se recogió y se lavó por centrifugación en PBS (500 x g, 5 minutos). El sedimento celular de uno de los duplicados se incubó (37 °C, 15 minutos) con 100  $\mu$ l de tripsina a una concentración de 1.6 mg/ml, mientras que el otro duplicado se incubó con el mismo volumen de PBS. Finalizada la incubación las dos series de tubos se lavaron por centrifugación (500 x g, 5 minutos). Las

muestras se analizaron, por citometría de flujo midiendo la diferencia en la intensidad de fluorescencia entre las muestras tratadas y las no tratadas con proteasas.

### **3.5.2.5 Identificación de los receptores celulares implicados en la unión/interacción de los promastigotes.**

Se realizaron experimento de infección *ex vivo* con sangre reconstituida empleando leucocitos o eritrocitos pretratados (30 minutos, 20° C) con AcM que reaccionan con distintos receptores celulares. Los AcM empleados fueron:

- 3D9 (IgG1). Reconoce el receptor CR1 presente en eritrocitos y leucocitos. Bloquea específicamente la interacción del fragmento C3b del complemento.
- Bear I (IgG1). Reconoce la cadena  $\alpha$  del receptor CR3 presente en leucocitos. Inhibe la unión del fragmento C3bi del complemento.
- 543 (IgG1). Reconoce un epítipo del CR1 distinto al que interacciona con el C3b.
- CD16 y CD32 (AcM adquiridos a SEROTEC). Reconocen a los receptores que unen la región Fc de las inmunoglobulinas.

### **3.6.-CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR TRAS LA INFECCIÓN POR *LEISHMANIA***

#### **3.6.1.- Determinación de citoquinas**

A 3 ml de sangre humana diluida al 50% en RPMI se añadieron promastigotes de *L. amazonensis* a una concentración final de  $10^6$ /ml. Como control positivo de ensayo se empleó sangre estimulada con PMA (25ng/ml), y como control negativo sangre sin estimular. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. A continuación se les añadió brefeldina ( $10\mu\text{g/ml}$ ) e ionóforo de calcio ( $1\mu\text{g/ml}$ ), y se dejaron incubando a 37 °C durante 24 h. A las 4 horas se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de sangre estimulada, y se incubaron (30 minutos, 20 °C) con los AcM fluoresceinados: CD14-FITC y CD15 FITC (BD). A continuación, se añadió a las muestras 2ml de solución de lisis de eritrocitos y se incubó 10 minutos a 20 °C. Finalizada la incubación, las muestras se lavaron por centrifugación (500 x g 5 minutos) y se procedió a fijar y permeabilizar las células con la solución IntraStain (DAKO) para realizar el marcaje intracelular de citoquinas. Para la localización intracelular de citoquinas, se emplearon los AcM comerciales marcados PE Anti-Human IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-12 p40/p70, IL-10 y TGF- $\beta$ 1. Tras realizar la tinción intracelular las células se analizaron en el citómetro de flujo.

#### **3.6.2.- Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en granulocitos**

La producción de especies reactivas del oxígeno se determinó según la metodología descrita en el apartado 3.5.2.3. A distintos tiempos, se llevaron a cabo infecciones en muestras de sangre por duplicado. A una de ellas se añadieron promastigotes marcados con CMFDA, y a la otra, promastigotes sin marcar. A esta última serie simultáneamente con los promastigotes se añadió carboxi- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  a la concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . En su forma reducida, el carboxi- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  no emite fluorescencia, pero al oxidarse en presencia de las especies reactivas del oxígeno que genera la célula activada se vuelve fluorescente y se detecta en el canal FL1 del citómetro de flujo. En la muestra conteniendo solo

promastigotes-CMFD A se seleccionó la población total de granulocitos por tamaño y complejidad, y dentro de ésta la subpoblación que había unido promastigotes (positiva en FL1). En la muestra que contenía carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA la señal detectada en FL1 se debía al estallido respiratorio generado por la activación de los granulocitos.

## 4.- RESULTADOS

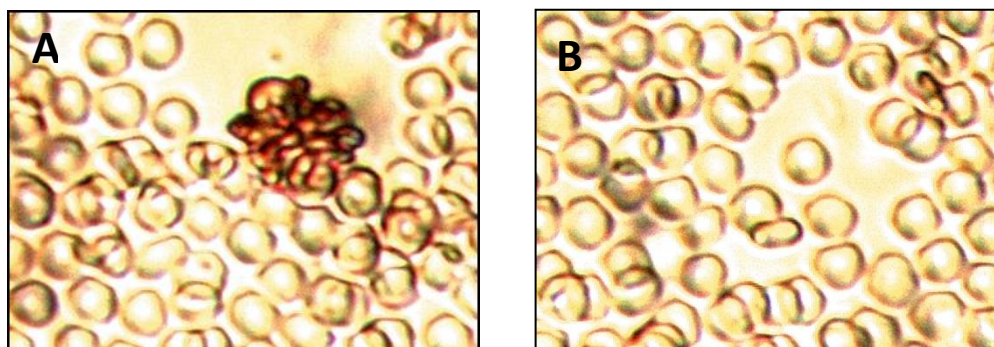




## 4.1 INTERACCIÓN DE LOS PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA* CON LAS CÉLULAS DE LA SANGRE HUMANA

### 4.1.1.- Interacción con los eritrocitos: reacción de IA

Resultados previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la reacción de IA que tiene lugar entre los promastigotes de *Leishmania*, el complemento y los eritrocitos humanos (23). Este resultado se confirmó preparando las muestras como se describe en Materiales y Métodos 3.5.1.1 para la visualización de los complejos de IA promastigotes-eritrocitos en el microscopio óptico de campo claro.



**Figura 4.1. Visualización de los complejos de IA al microscopio óptico entre promastigotes y eritrocitos humanos.** Observación realizada en el microscopio invertido de campo claro (277 x). A: Sangre normal. B: sangre normal/EDTA 10 mM.

Los complejos de IA formados se muestran como agregados de promastigotes rodeados de eritrocitos, con la típica morfología de las rosetas de una reacción de IA (Figura 4.1A). Como control negativo del ensayo se añadió EDTA (10mM final) a la sangre para inhibir la activación del sistema del complemento; en este caso, se inhibe la opsonización de los promastigotes y la subsecuentemente la formación de los complejos de IA (Figura 4.1B).

Para determinar la cinética de la reacción de IA, a una mezcla de reacción compuesta por suero y eritrocitos humanos se añadieron promastigotes de *L. amazonensis* o de *L. infantum* marcados con CMFDA y se incubó a 37°C a distintos tiempos. El porcentaje

de parásitos unidos a eritrocitos se determinó por citometría de flujo tras separar a través de un gradiente de percoll los eritrocitos del resto de poblaciones sanguíneas.

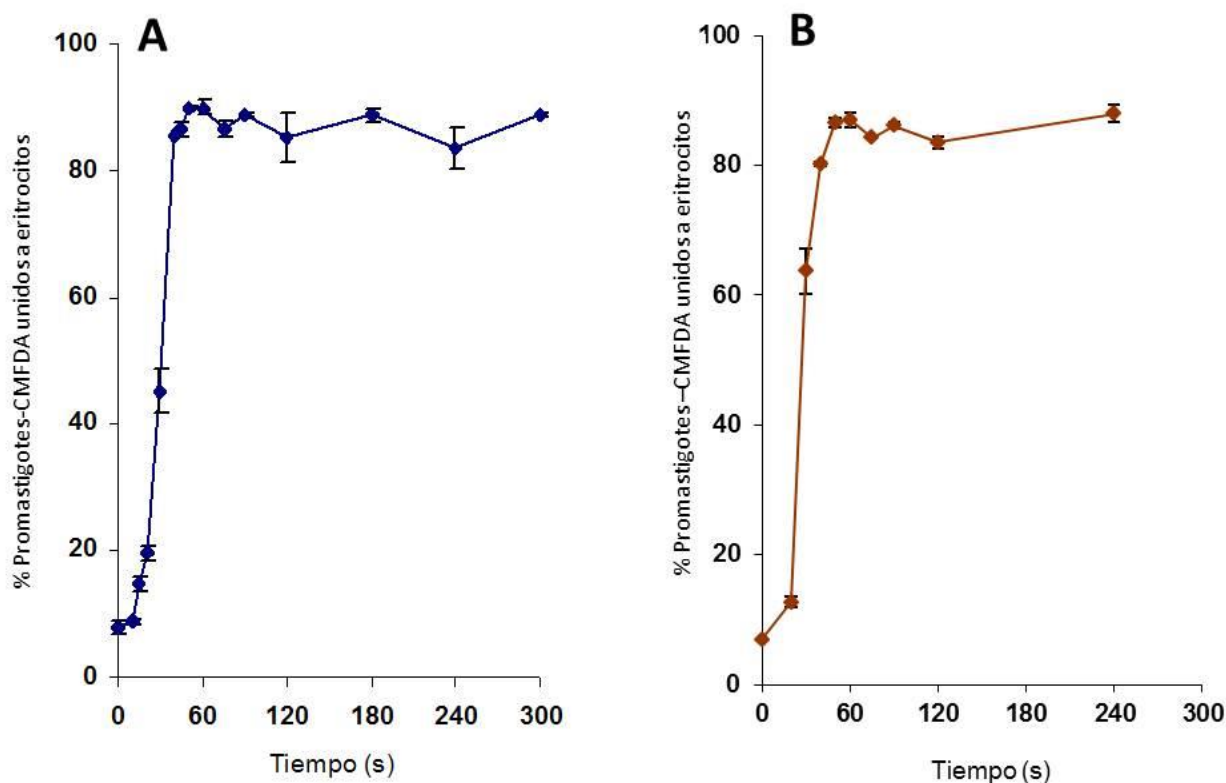
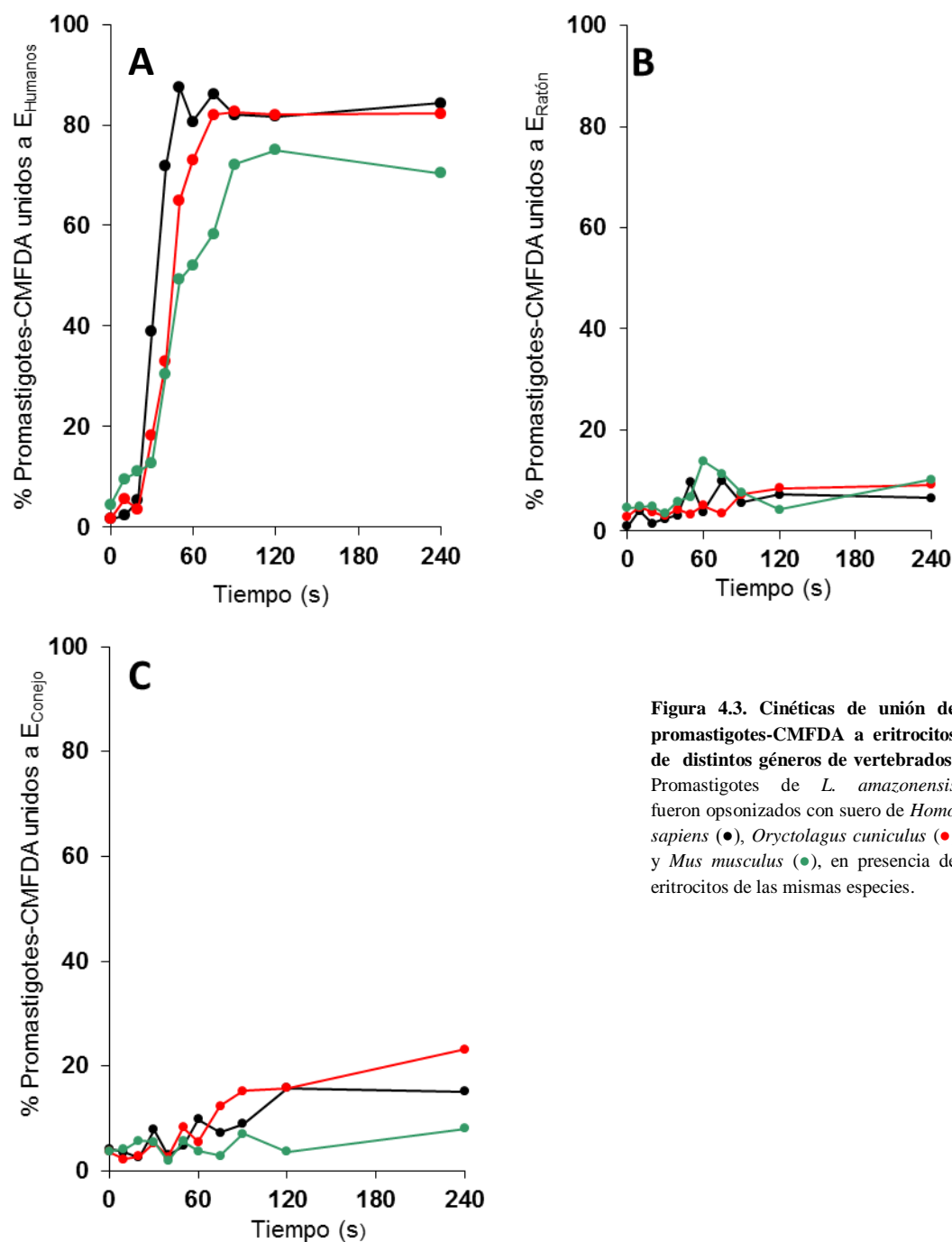


Figura 4.2 Cinética de la reacción de IA inmunoadherencia para *L. amazonensis* (A) y *L. infantum* (B) durante la infección  $10^7$  promastigotes-CMFA con SHN al 25% en presencia de EH al 40% (v/v). Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  EE de al menos tres experimentos.

La figura 4.2 muestra el porcentaje de promastigotes unido a eritrocitos a cada tiempo de medida según se indica en el apartado de 3.5.1.2. La unión es extremadamente rápida; comienza alrededor de los 20 segundos de incubación, y a los 40 segundos un 90% de los parásitos se encuentra unido a eritrocitos. A partir de este momento, y durante el resto del ensayo, el porcentaje de unión se mantiene constante.

Para establecer si existen incompatibilidades de género entre los componentes que participan en la reacción de IA (eritrocitos y complemento humano), se reconstituyeron artificialmente tres tipos de sangre según se describe en el apartado 3.5.1.3.1. Para ello, se incubaron promastigotes de *L. amazonensis* con suero y eritrocitos de humano, ratón y conejo en todas las combinaciones posibles.



**Figura 4.3. Cinéticas de unión de promastigotes-CMFDA a eritrocitos de distintos géneros de vertebrados.** Promastigotes de *L. amazonensis* fueron opsonizados con suero de *Homo sapiens* (●), *Oryctolagus cuniculus* (●) y *Mus musculus* (●), en presencia de eritrocitos de las mismas especies.

La Figura 4.3 muestra las cinéticas de unión de promastigotes opsonizados con los tres sueros de vertebrados a eritrocitos humanos  $E_H$  (A), de ratón  $E_R$  (B) y de conejo  $E_C$  (C). Los  $E_H$  son capaces de interaccionar con los promastigotes de *Leishmania* opsonizados por los distintos sueros; (Figura 4.3A). Por el contrario, cuando se utilizaron  $E_R$  (Figura 4.3B) y  $E_C$  (Figura 4.3C) y con independencia del suero empleado, el porcentaje de

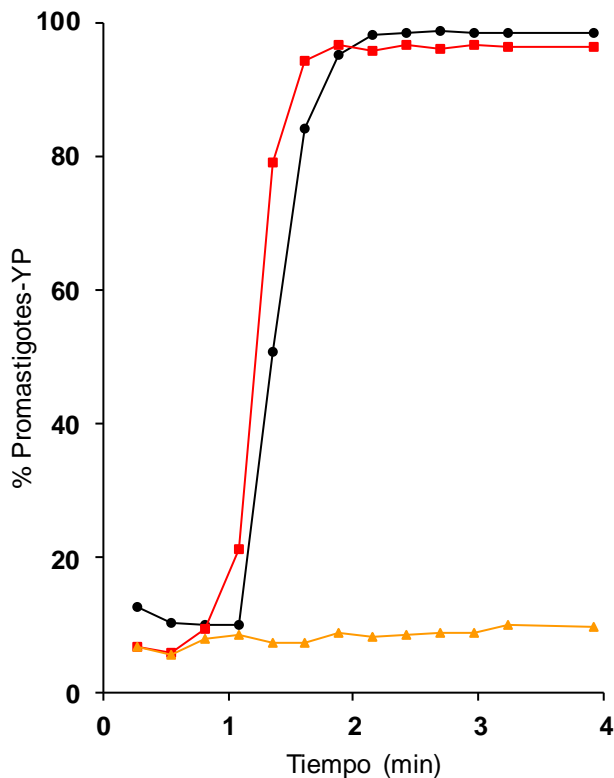
promastigotes unido a eritrocitos no superaba en ningún caso el 20% en los tiempos utilizados en el ensayo (0-4 minutos).

La formación de los complejos de IA se confirmó mediante el examen al microscopio óptico. Las muestras se prepararon según se describe en 3.5.1.3.1. para realizar las combinaciones de eritrocitos y suero de las tres especies arriba descritas. Los resultados alcanzados, presentados en la Tabla 4.1 son idénticos a los mostrados en la Fig. 4.3.

	Promastigotes opsonizados con suero		
	Humano	Conejo	Ratón
Eritrocitos humanos	+	+	++
Eritrocitos de conejo	-/+	-	-
Eritrocitos de ratón	-	-	-

Tabla 4.1. Formación de complejos de IA entre eritrocitos de distintos vertebrados y promastigotes opsonizados con suero homólogo y con dos sueros heterólogos.

Es sabido que los promastigotes son susceptibles a la acción del complemento humano (75). Para contrastar si la muerte de los parásitos se veía influenciada por su unión a los E<sub>H</sub> se añadieron  $5 \times 10^5$  promastigotes de *L. amazonensis* a mezclas de reacción conteniendo suero humano normal (SHN) con y sin eritrocitos (E<sub>H</sub>) según se detalla en 3.5.1.3.2.



**Figura 4.4. Cinética de lisis de promastigotes de *L. amazonensis* en presencia o ausencia de eritrocitos.** Se opsonizaron promastigotes con SHN al 50%, en presencia (●) o ausencia (■) de eritrocitos humanos. Como control negativo de lisis se utilizó SHN/EDTA (▲).

La Figura 4.4 muestra las cinéticas de incorporación YP (muerte celular) a promastigotes de *L. amazonensis* opsonizados con SHN en presencia o ausencia de  $E_H$ . Los porcentajes de parásitos que incorporaban YP fueron idénticos en ambos casos, alcanzando el 95% de incorporación de YP a los 2 minutos de incubación, porcentaje que se mantuvo a lo largo de todo el ensayo. Como control negativo, se utilizó suero humano en presencia de EDTA; en este caso la incorporación de YP al parásito no superó el 10%. Por tanto, la formación del complejo de IA no protege a los promastigotes de la acción citotóxica del complemento humano.

#### 4.1.2.- Caracterización de otros componentes celulares sanguíneos que interaccionan con el complejo de IA

Como se acaba de mostrar la incubación de los promastigotes de *Leishmania* con SHN produce la muerte de la práctica totalidad de los parásitos. Una vez descartado el posible efecto protector del eritrocito frente a la acción tóxica del complemento (Fig 4.4), se abordó el estudio de la interacción de los promastigotes que son vehiculados desde los complejos de IA con las células fagocíticas profesionales de la sangre.

Para que tenga lugar la transferencia de los promastigotes desde los complejos de IA a los leucocitos aceptores de la sangre ha de producirse la liberación de los parásitos unidos a los eritrocitos. Para determinar el grado de liberación de los promastigotes de los complejos de IA se realizó un ensayo con dos tipos de sangres, una normal que contenía la totalidad de sus componentes y otra reconstituida en la que se había eliminado la población de leucocitos.

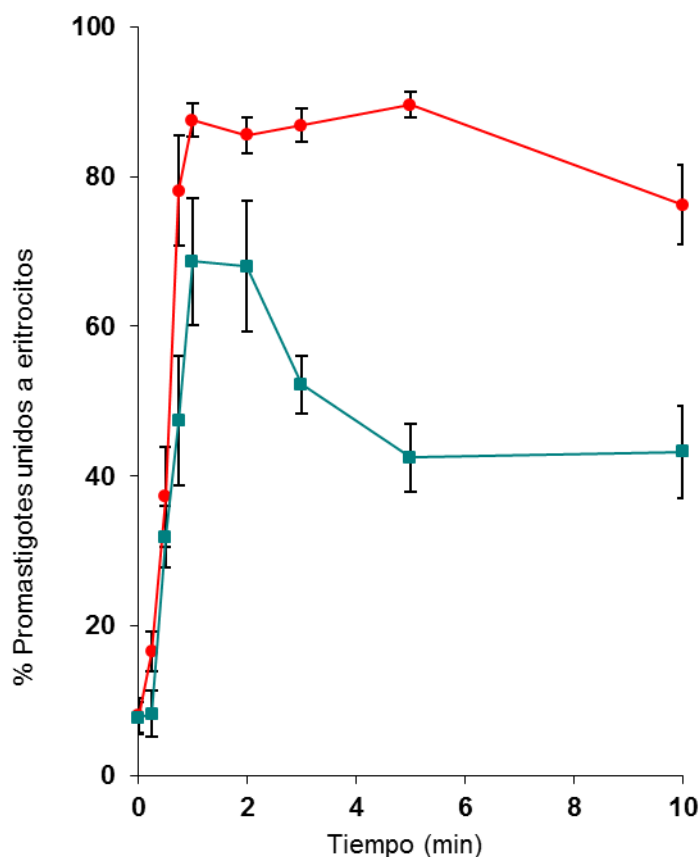
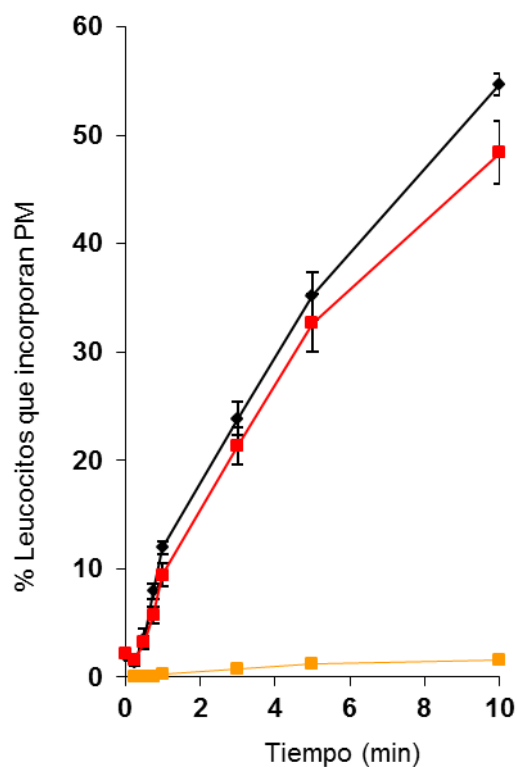


Figura 4.5. Curso de liberación de los promastigotes-CMFDA desde los complejos de IA. Sangre completa (■), o sangre deplecionada de leucocitos (●). Los resultados son la media  $\pm$  EE de al menos 5 experimentos

La Figura 4.5, muestra el porcentaje de promastigotes que permanece unido a los eritrocitos formando parte del complejo de IA al incubar los parásitos con ambas muestras de sangre. Durante el primer minuto de incubación se constata la rápida unión de los promastigotes a los eritrocitos de ambas sangres para formar complejos de IA. Sin embargo, en la sangre carente de leucocitos un 80-90% de los parásitos permanecía unido a los eritrocitos durante todo el ensayo, mientras que en la sangre completa, ya desde el primer minuto de incubación, se observaba una disminución progresiva del porcentaje unido. Entre el primer y segundo minuto, se retiene ~75% de los promastigotes unidos a eritrocitos y a los 3 minutos los parásitos retenidos eran de entre 70% al 60%; A los 5 y 10 minutos el porcentaje de promastigotes unidos a los eritrocitos fue del 40% de los promastigotes totales. Estos datos indican que se produce una transferencia de parásitos desde los complejos de IA a los leucocitos.

Una vez comprobado que los eritrocitos no protegen al promastigote de la acción del complemento (fig 4.4) y que su liberación de los complejos de IA depende de la presencia de leucocitos en la sangre (fig 4.5), pasamos a identificar las poblaciones celulares involucradas en el proceso de infección. En primera instancia se comprobó que la sangre reconstituida se comportaba en los experimentos de infección de forma similar a la sangre normal, y en segundo lugar se cuantificó el número de promastigotes presentes en el inóculo con el fin de obtener medidas fiables cuando se analizan las distintas etapas del proceso infectante: muerte de los parásitos por complemento, su transferencia a las poblaciones leucocitarias e interiorización en las célulasceptoras. Finalmente, se determinó el período de tiempo más adecuado analizar la cinética de infección.

Para ello se incubaron (37°C durante 0-10 minutos) promastigotes de *L. amazonensis* marcados fluorescentemente con CMFDA, con sangre reconstituida y con sangre normal determinándose su cinética de unión a los leucocitos.

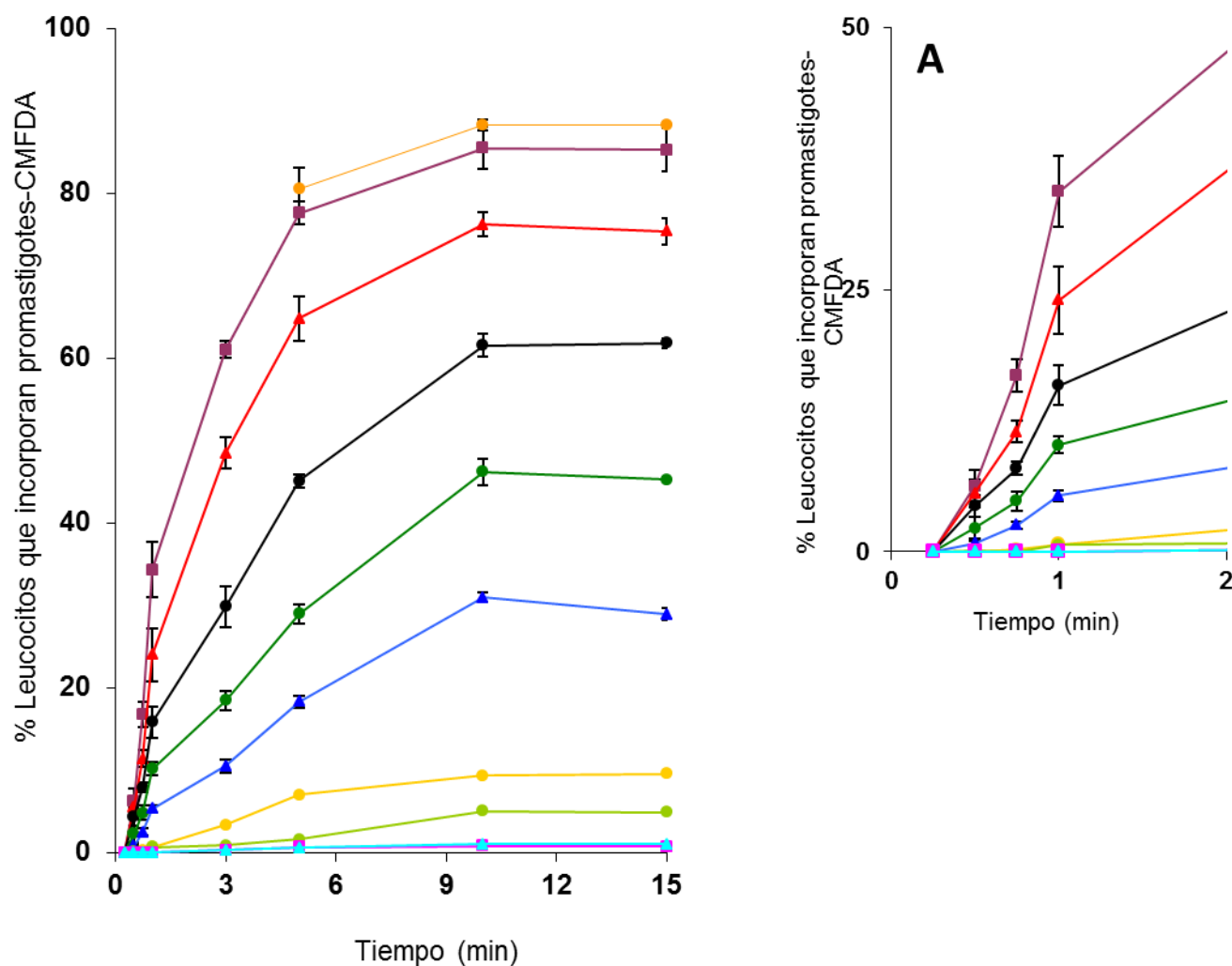


**Figura 4.6. Cinéticas de transferencia de *L. amazonensis* en sangre completa y modificada.** Promastigotes-CMFDA se incubaron (37°C, 0-10 minutos) con sangre completa (■) o modificada (●) y se determinó, por citometría de flujo, el porcentaje de leucocitos que incorporaron el parásito. Como control negativo de ensayo se utilizó sangre tratada con EDTA (■). Los resultados corresponden a la media  $\pm$  EE de al menos 3 experimentos.

Como se observa (Fig. 4.6), las cinéticas de transferencia de los promastigotes desde los complejos de IA a los leucocitos de las sangres normal y reconstituida es prácticamente idéntico, al igual que lo son los porcentajes de leucocitos que incorporan promastigotes. Tras 1, 3 y 5 minutos de incubación, el ~10,5%, ~22% y ~33% de los leucocitos unían/incorporaban parásitos, respectivamente. Como control negativo, se utilizó sangre tratada con EDTA (10 mM, final); en este caso, la transferencia no alcanzó al 1% de los leucocitos.

Acto seguido, se estudió la cinética de transferencia de promastigotes a los leucocitos de la sangre en un ensayo de infección utilizando concentraciones crecientes de parásitos que iban de  $10^4$  a  $10^7$ . Tras la incubación, se determinó el porcentaje de leucocitos que habían unido promastigotes.





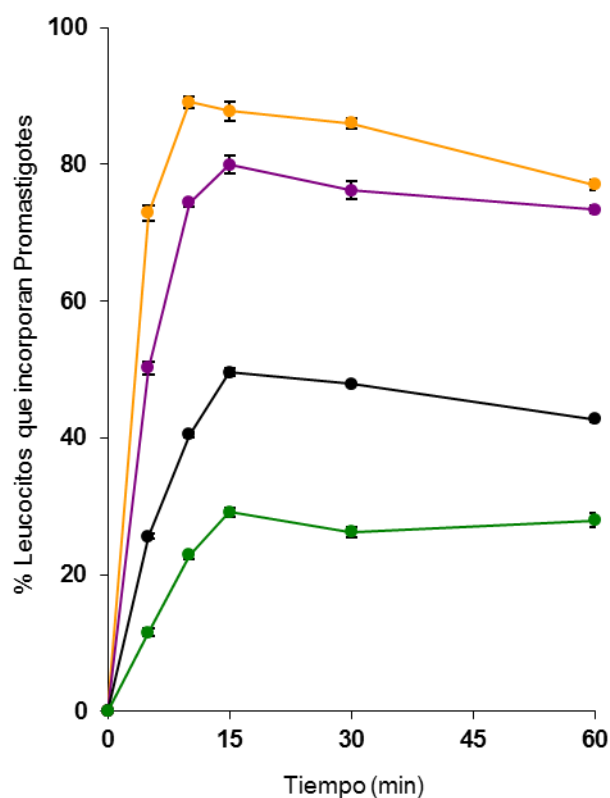
**Figura 4.7. Cinéticas de unión de promastigotes-CMFDA a leucocitos de sangre durante 15 minutos.** Se incubaron (37° C, 0-15 minutos) muestras de sangre modificada con diferentes concentraciones s de promastigotes-CMFDA de *L. amazonensis*. Los cocientes promastigotes/ leucocito fueron los siguientes: 10/1 (●); 4/1 (■); 2/1 (▲); 1/1 (●); 0.5/1 (●); 0.25/1 (▲); 0.1/1 (●); 0.05/1 (●); 0.025/1 (■); 0.01/1 (▲). Los resultados corresponden a la media  $\pm$  EE de al menos 3 experimentos. El inserto A corresponde a la representación ampliada de los 2 primeros minutos del gráfico A.

Los resultados (Fig. 4.7) muestran que a medida que se incrementaba la concentración de promastigotes del inóculo aumentaban los porcentajes de leucocitos que unían parásitos, hasta que a la relación promastigote era cuatro veces superior a la de leucocitos, a partir de aquí el aumento de parásitos en el inóculo no suponía un incremento en el porcentaje unión a los leucocitos. Los porcentajes de unión alcanzados a los 1, 5, 10 y 15 minutos de incubación se muestran en la Tabla 4.2, donde puede verse a partir de los 10 minutos de incubación el porcentaje de leucocitos que incorporaban promastigotes había alcanzado el máximo.

		PROMASTIGOTES / LEUCOCITOS									
		0,01	0,025	0,05	0,10	0,25	0,50	1	2	4	10
Tiempo	1	0	0	0	0	5,3	10,1	15,8	24,0	34,3	-
	5	0,5	0,6	1,6	6,7	17,9	28,8	45,1	65,2	78,1	81,3
	10	1	1	4,9	8,8	30,7	46,0	60,9	75,9	85,5	88,3
	15	1	1	4,8	9,6	29,0	45,2	61,8	75,4	85,3	88,3

Tabla 4.2. Porcentaje de unión de promastigotes a leucocitos a los distintos tiempos de medida.

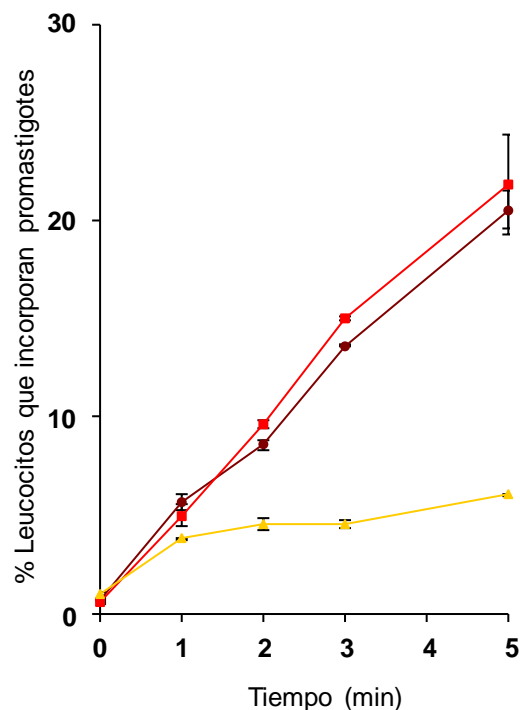
Para contrastar este dato se realizó un experimento de infección de sangre humana similar al mostrado en la Fig 4.7, utilizando ratios de promastigote/leucocito de 10, 4, 1 y 0,5, y ampliando los tiempos de incubación hasta 1 hora. El resultado muestra que el porcentaje de leucocitos que unen promastigotes no aumentaba a partir de los 15 minutos de incubación, (Figura 4.8).



**Figura 4.8. Cinéticas de unión de promastigotes-CMFDA de *L. amazonensis* en sangre modificada durante 60 minutos.** Se incubaron promastigotes de *L. amazonensis* con sangre humana modificada en proporciones de promastigote/leucocito de 10/1 (●); 4/1 (●); 1/1 (●) y 0.5/1 (●). Se determinó, por citometría, el porcentaje de leucocitos que incorporaron el parásito. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  EE de al menos tres experimentos.

Para explicar por qué la transferencia de los promastigotes a los leucocitos se mantenía constante a partir de los 15 minutos de infección, con independencia de la dosis presente en el inóculo, se realizaron infecciones de sangre con tres preparaciones distintas de promastigotes de *L. amazonensis*: A) promastigotes opsonizados (37°C, 1 minuto) con SHN al 25%; B) promastigotes opsonizados (37°C, 15 minutos) con 25% SHN; C) promastigotes no opsonizados.

Los promastigotes de los inóculos A) y B) se añadieron a muestras de sangre formadas únicamente por eritrocitos y leucocitos y donde el volumen de suero se había sustituido por un volumen igual de PBS; en el caso del inóculo C) los promastigotes se añadieron a una muestra de sangre reconstituida según se describe en materiales y métodos 3.3.4. Tras la incubación, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo determinándose el porcentaje de leucocitos que fijaban parásitos.



**Figura 4.9. Cinética de transferencia de promastigotes-CMFDA opsonizados.** Promastigotes de *L. amazonensis*, se opsonizaron con suero humano normal a 37°C durante 1 minuto (●) y 15 minutos (▲) se incubaron con leucocitos y eritrocitos humanos (37°C, 0-5 minutos). Como control positivo de ensayo se incubaron promastigotes con sangre humana modificada (■). Los resultados son media  $\pm$  EE de al menos tres experimentos.

La Figura 4.9 muestra los porcentajes de leucocitos que unían promastigotes previamente opsonizados con suero humano durante 1 y 15 minutos. Como control del ensayo se infectó sangre reconstituida con promastigotes sin opsonizar; en este caso los resultados fueron semejantes a los obtenidos tras opsonizar los parásitos durante un

minuto. Por el contrario, tras 15 minutos de opsonización, apenas el 5% de los leucocitos unían promastigotes a los tiempos ensayados (0 - 5 minutos). Este resultado sugiere que la exposición de los parásitos al suero humano durante 15 minutos influye en el porcentaje de transferencia los leucocitos. Causas probables de este comportamiento pudieran ser la pérdida de viabilidad/integridad de los parásitos tras su largo contacto con el suero, o quizás la degradación del fragmento C3b del complemento en C3bi, lo que influiría en la formación del complejo de IA y/o la transferencia del parásito al leucocitos.

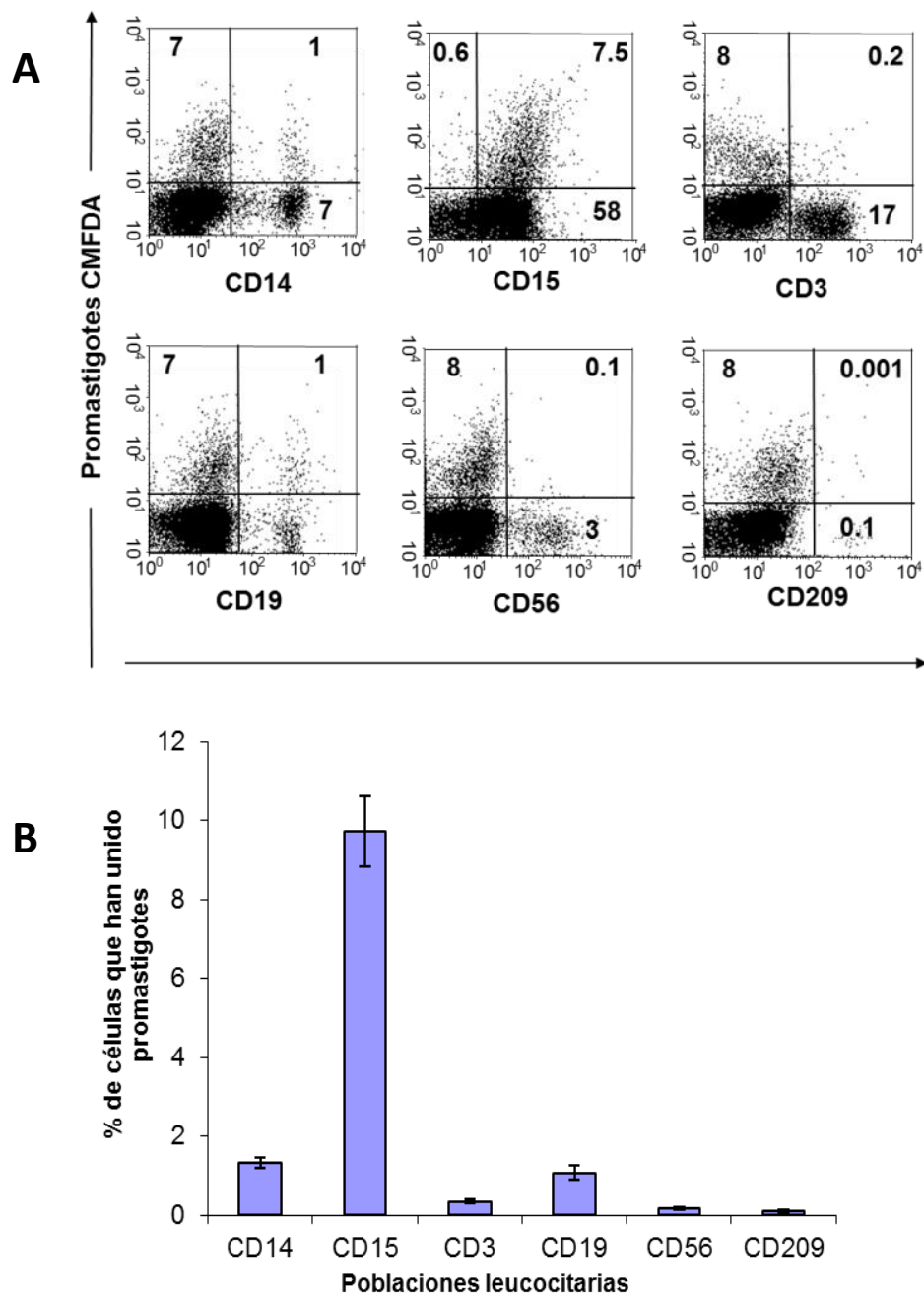
#### **4.1.2.1.- Interacción de los promastigotes con los leucocitos**

##### **4.1.2.1.1.- Unión de los promastigotes a las distintas poblaciones leucocitarias de la sangre**

Los experimentos realizados hasta este punto nos permitían conocer el curso que siguen los promastigotes desde el momento en que se forma el complejo de IA hasta su unión a la célula aceptora. Además, se establecieron las condiciones adecuadas de tiempo de infección y concentración de parásitos que forman el inóculo infectivo.

A partir de éste momento, hemos perseguido identificar las subpoblaciones leucocitarias "aceptoras" de promastigotes, cuantificar el grado de interiorización de los parásitos y establecer la cinética de las reacciones que participan en la infección. Para simular en lo posible el mecanismo infectante natural, se utilizó un ensayo de infección de sangre humana heparinizada con una dosis de promastigotes de un orden similar a la supuestamente regurgitada por el flebótomo durante la infección natural (76).

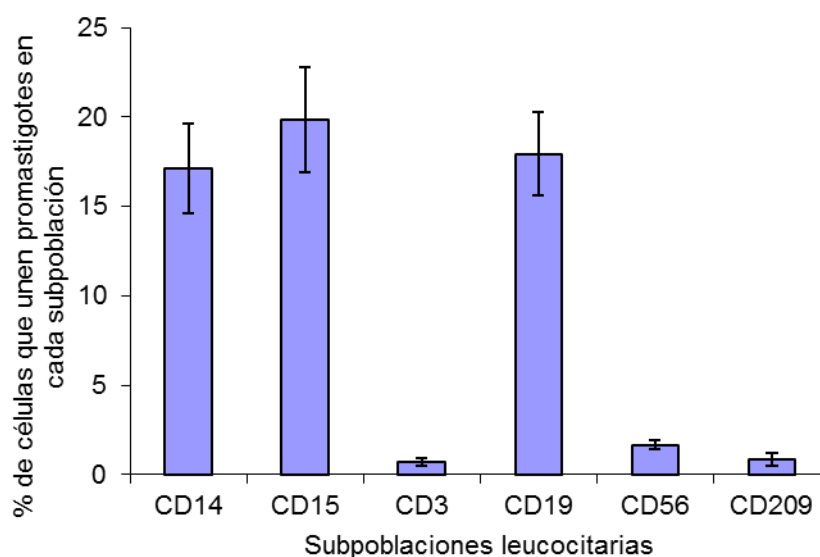
Para medir la unión de los parásitos a los leucocitos se incubaron promastigotes marcados con CMFDA con sangre heparinizada según se describe en 3.5.2.3, y transcurridos los 5 minutos de infección se midió por citometría de flujo el porcentaje de cada una de las subpoblaciones de leucocitos que unía promastigotes. Las poblaciones leucocitarias se identificaron con AcM antiCD15 (granulocitos), antiCD14 (monocitos), antiCD3 (células T), antiCD19 (células B), antiCD56 (+NK) y antiCD209 (monocitos/dendríticas), marcados con fluorocromos distintos a la fluoresceína. El resultado de un experimento representativo se muestra en la Figura 4.10. A



**Figura 4.10. Porcentaje de subpoblaciones de leucocitos de la sangre que unen promastigotes:** promastigotes-CMFD se incubaron (5 min) con sangre heparinizada y se determinó por citometría de flujo el porcentaje de cada subpoblación de leucocitos que unían promastigotes. Las subpoblaciones de leucocitos fueron identificadas empleando anticuerpos monoclonales específicos. En A se muestran los gráficos de puntos de un experimento representativo. En B se muestra el porcentaje de cada subpoblación que unía promastigotes con respecto al total de leucocitos de la sangre. Los valores corresponden a la media  $\pm$  EE de 14 experimentos realizados con sangre de seis donantes.

La Figura 4.10 B, se muestra el porcentaje de células de cada subpoblación que une promastigotes con respecto al total de leucocitos. A los 5 minutos de incubación el 13% de los leucocitos de la sangre unían promastigotes de los cuales el 10,7% + 0.15% eran CD14+ (monocitos), el 76,3% + 0.8% eran CD15+ (granulocitos), el 2,7% + 0.1% eran CD3+ (linfocitos T), el 8,5% + 0.2% eran CD19+ (linfocitos B), el 1.3% + 0.02% eran células CD3-CD56+ (células NK) y el 0.49% + 0.03% eran células CD209+. Cabe indicar que una fracción no despreciable, 8,5% del total de leucocitos que unen promastigotes, son linfocitos B en el periodo inicial de la infección. De acuerdo con estos datos los granulocitos son la principal subpoblación aceptora de parásitos.

Cuando se analiza el porcentaje de células de cada subpoblación de leucocitos que unían promastigotes los datos son muy similares (Figura 4.11). Así, el porcentaje de células que unen promastigotes dentro de la subpoblación de CD15+ era un 19.1±2.4%, dentro de la subpoblación CD14+ el 17.3% ± 2.3% y en la CD19+ el 17.4% ± 2.5%. El resto de poblaciones leucocitarias no unían apreciablemente promastigotes en la etapa temprana de la infección.

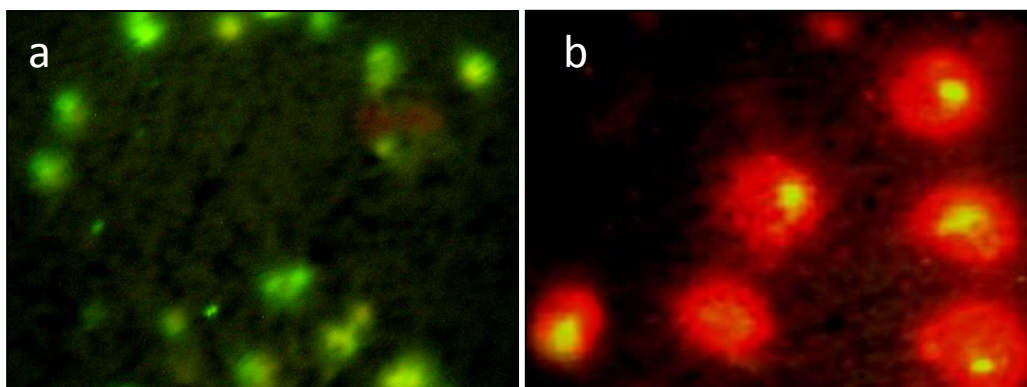


**Figura 4.11. Análisis porcentual de la unión de promastigotes-CMFDA en cada una de las subpoblaciones leucocitarias.** Se representa el porcentaje de células de cada subpoblación de leucocitos que unen promastigotes con respecto al total de esa subpoblación. Los valores representados corresponden a la media ± EE de 14 experimentos

#### 4.1.2.1.2.- Cinética de unión e interiorización de los promastigotes del inóculo infeccioso a granulocitos y monocitos

En experimentos preliminares (datos no presentados) pudimos observar que solo granulocitos y monocitos internalizaban promastigotes.

Para determinar la fracción de promastigotes interiorizados en las poblaciones aceptoras de leucocitos se llevaron a cabo experimentos de infección de sangre *ex vivo* con parásitos marcados con CMFDA. Se incubaron a 37°C durante distintos tiempos (0-30 min) y por duplicado, 100 µl de sangre completa con 10 µl de promastigotes ( $10^8$  células/ml); la relación célula aceptora/promastigote fue ~ de 1/1. Al término de las incubaciones las muestras se procesaron según se indica en 3.5.2.4 A y el porcentaje de leucocitos y monocitos infectados a cada tiempo se determinó por citometría de flujo midiendo la diferencia existente en la intensidad de fluorescencia de las muestras tratadas y no tratadas con azul de tripano. El azul de tripano apantalla la emisión de fluorescencia de los parásitos adheridos a la superficie celular muertos por acción del complemento, pero no penetra en la célula intacta y la emisión de fluorescencia por los promastigotes interiorizados permanece inalterada. La Figura 4.12 muestra una imagen al microscopio óptico de la fluorescencia emitida por promastigotes marcados (a) con CMFDA, y (b) marcadas con CMFDA y tratados con azul tripano, donde se observa que solo emiten señal fluorescente los promastigotes interiorizados.



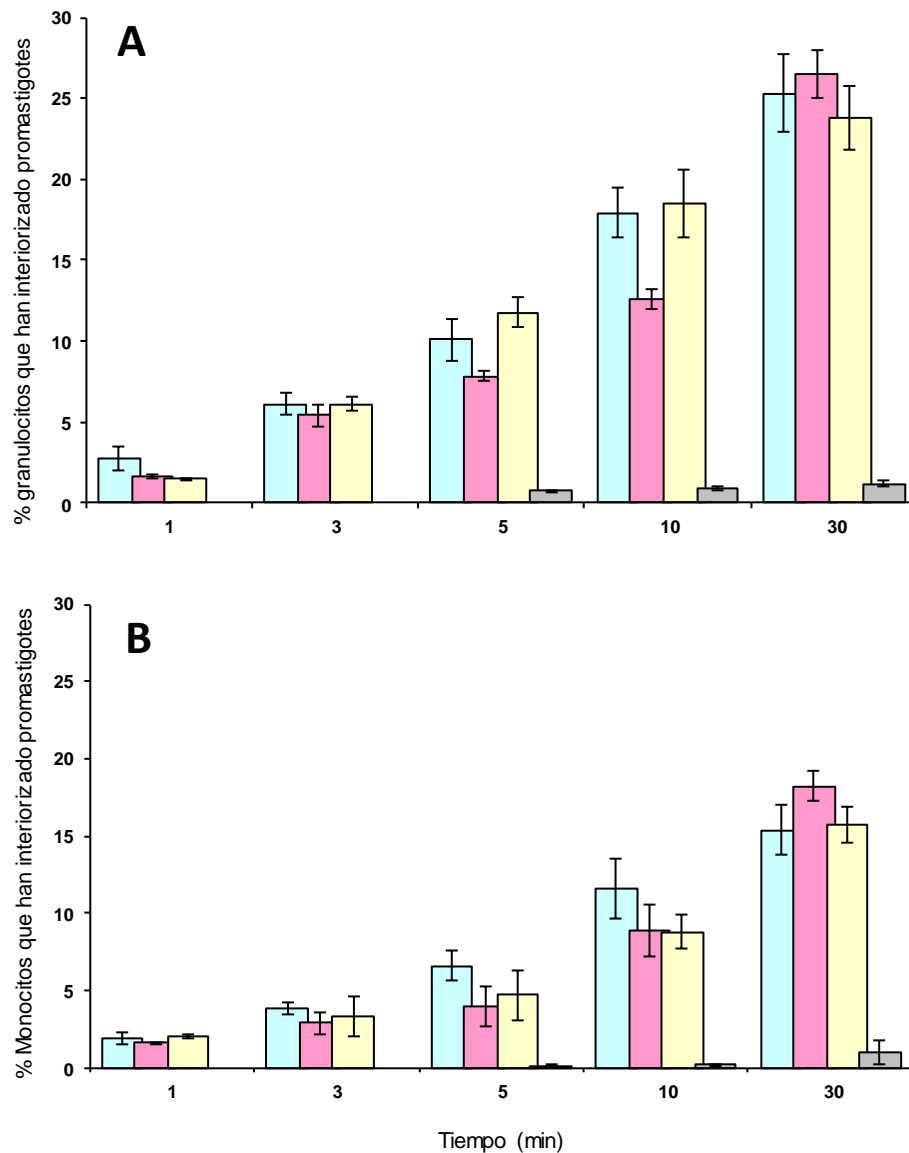
**Figura 4.12.** Imágenes al microscopio de fluorescencia de leucocitos después de haber sido infectados por *Leishmania*. Se realizó una infección *ex vivo* de sangre humana con promastigotes-CMFD de *L. amazonensis*. A) imagen de los promastigotes fluorescentes unidos y/o internalizados a granulocitos. B) Imagen de promastigotes internalizados en granulocitos de una muestra de sangre tratada con azul tripano. (Imagen 759 x).

Para asegurar la fiabilidad del apantallamiento con azul de tripano se realizaron dos ensayos de infección adicionales. En el primero de estos (3.5.2.4 B), tras la infección de

la sangre la mitad de la muestra se permeabilizó y los promastigotes se marcaron con el anticuerpo monoclonal anti*L. amazonensis* SIM 6.11.2.1-FITC (fluoresceinado). El análisis de las muestras se realizó midiendo la diferencia entre la intensidad de fluorescencia emitida por las muestras permeabilizadas y las no permeabilizadas a cada tiempo de incubación. En el segundo ensayo adicional (3.5.2.4 C) las muestras de sangre infectada se trataron con el anticuerpo monoclonal anti*L. amazonensis* SIM 6.11.2.1-FITC y posteriormente se sometieron a un tratamiento con proteasas que elimina el anticuerpo monoclonal de la superficie de los promastigotes que se encuentran unidos externamente a las células pero no de aquellos que han sido interiorizados.

Los datos de la Figura 4.13 muestran el porcentaje de leucocitos que interiorizan promastigotes y se observa que las tres técnicas proporcionan un resultado similar. No obstante, dado que el uso de promastigotes marcados con CMFDA como inóculo infectante era el procedimiento que menos etapas metodológicas requiere para cuantificar los parásitos interiorizados, fue el elegido en posteriores análisis.



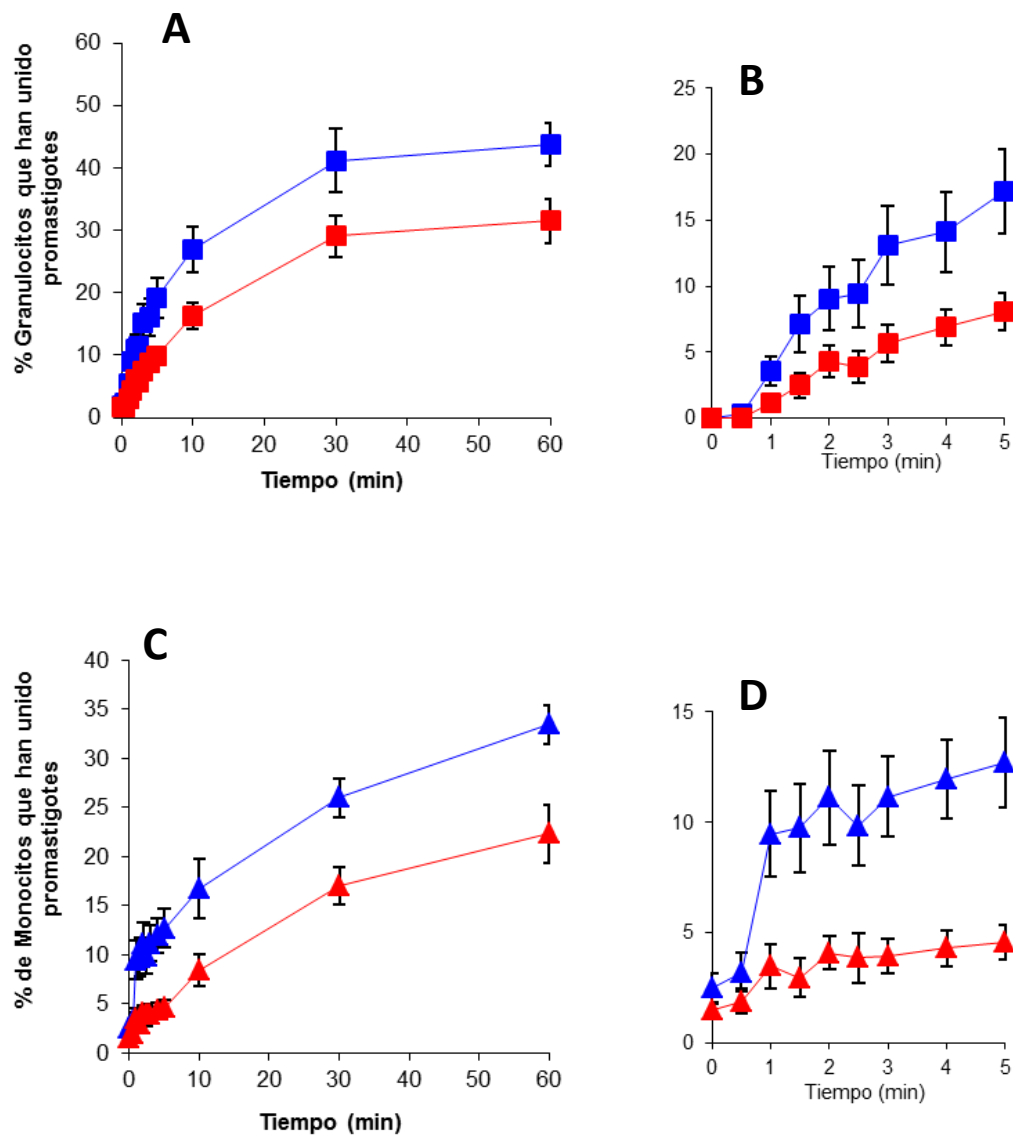


**Figura 4.13. Determinación de los porcentajes de leucocitos que interiorizan promastigotes en la infección humana por *Leishmania*.** Se realizó una infección de sangre ex vivo con promastigotes-CMFDA de *L.amazonensis*, y se determinó el porcentaje de granulocitos (A) y monocitos (B) que habían interiorizado promastigotes. Muestras tratadas con: azul tripano (■), solución permeabilizante (■) y proteasas (■). Control negativo del ensayo sangre tratada con EDTA (■). Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  EE de al menos tres experimentos.

El estudio de la cinética de unión e interiorización de los promastigotes de *L. amazonensis* a granulocitos y monocitos humanos, se llevó a cabo con promastigotes marcados con CMFDA en una infección de sangre ex vivo a lo largo de 60 minutos. A distintos tiempos se tomaron muestras, por duplicado, y en las poblaciones de granulocitos y monocitos identificadas en el citómetro de flujo por tamaño y complejidad, se determinó

el porcentaje de células que fijaban promastigotes, es decir células positivas en el canal FL1 que recoge la fluorescencia emitida por CMFDA. En este caso, la fluorescencia emitida corresponde a la suma de los promastigotes totales, es decir externos a la célula e interiorizados. El porcentaje de granulocitos y monocitos que interiorizaban promastigotes se determinó utilizando azul de tripano para extinguir la fluorescencia emitida por los parásitos unidos a la célula y muertos por la acción del complemento.

En la Figura 4.14 se presentan las cinéticas de unión e interiorización de promastigotes a granulocitos (4. 14A) y monocitos (4. 14B). El curso de las reacciones de unión e interiorización de los parásitos fue prácticamente lineal durante los 10 primeros minutos de infección tanto en monocitos como en granulocitos, tomando forma hiperbólica a partir de este momento. La infección puede considerarse finalizada a los 60 minutos. A los 30 minutos, alrededor del 39,2 % (94% del total unido) de los granulocitos han fijado promastigotes mientras que los monocitos lo han hecho en un 23,5% (76% del total unido).



**Figura 4.14. Cinética de unión e interiorización de promastigotes de *L. amazonensis* a leucocitos de la sangre humana.** Cinética de unión de promastigotes-CMFDA a (A) granulocitos o (C) monocitos, identificados por tamaño (FSC) y complejidad (SSC). El porcentaje de granulocitos (■) o de monocitos (▲) que unían promastigotes se determinó como el porcentaje de células que emitían fluorescencia en el canal de FL1 (530nm) a cada tiempo de medida. El porcentaje de granulocitos (■) o monocitos (▲) que interiorizan promastigotes se determinó usando azul de tripano para apantallar la fluorescencia emitida por los promastigotes extracelulares. B y D corresponden a las representaciones de los 5 primeros minutos de interacción de los promastigotes con granulocitos y monocitos respectivamente. (M+EE n=14 con sangres de 6 donantes).

De acuerdo con estos resultados denominamos tiempo o periodo eficaz de infección el comprendido entre los 0 y 5 minutos en el que la velocidad de la interacción parásito-leucocito es proporcional al tiempo (Figuras 4.14 B y Figura 4.14 D). Transcurridos tres minutos de infección, la proporción de leucocitos que habían unido:interiorizado promastigotes fue del 12%:5% en granulocitos y de 7%:2% en monocitos. Tras 5 minutos de infección dichos valores fueron 20%:8% en granulocitos y de 10%:3% en monocitos.

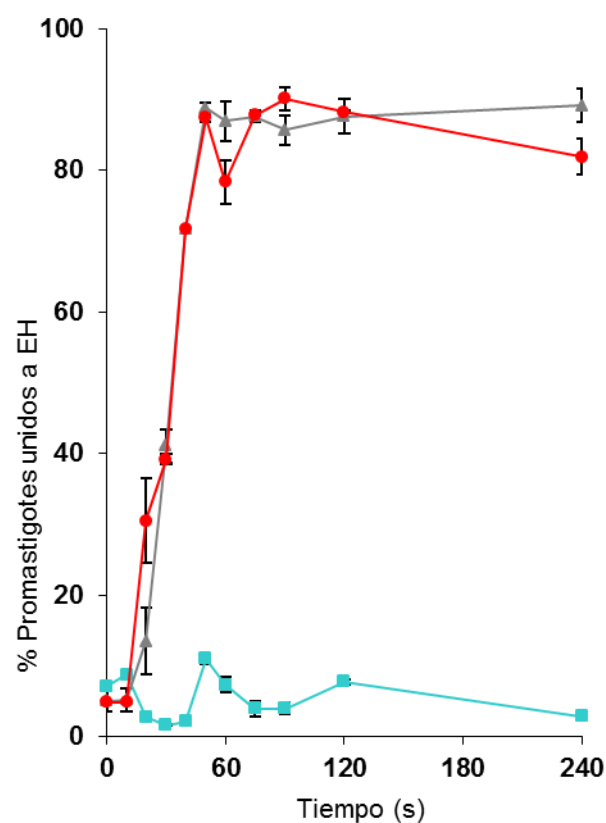
#### 4.1.2.1.3.- Receptores celulares implicados en la infección de sangre por *Leishmania*

En lo que sigue, se describen los tratamientos realizados a eritrocitos y leucocitos humanos para evaluar su efecto sobre el mecanismo de IA y la infección del promastigote.

##### 1) Tratamiento de eritrocitos:

Para inhibir la reacción de IA de los parásitos opsonizados por complemento se incubaron promastigotes de *L. amazonensis* marcados con CMFDA con suero y eritrocitos humanos, estos últimos pre-incubados con el AcM 3D9 como se describe (materiales y métodos 3.5.2.5). Como controles del ensayo se utilizaron eritrocitos pre-incubados con PBS o con el AcM 543; este último, no interfiere con el sitio de unión del C3b ya que reacciona con un epítipo del receptor CR1 distinto al reconocido por el AcM 3D9 (56).

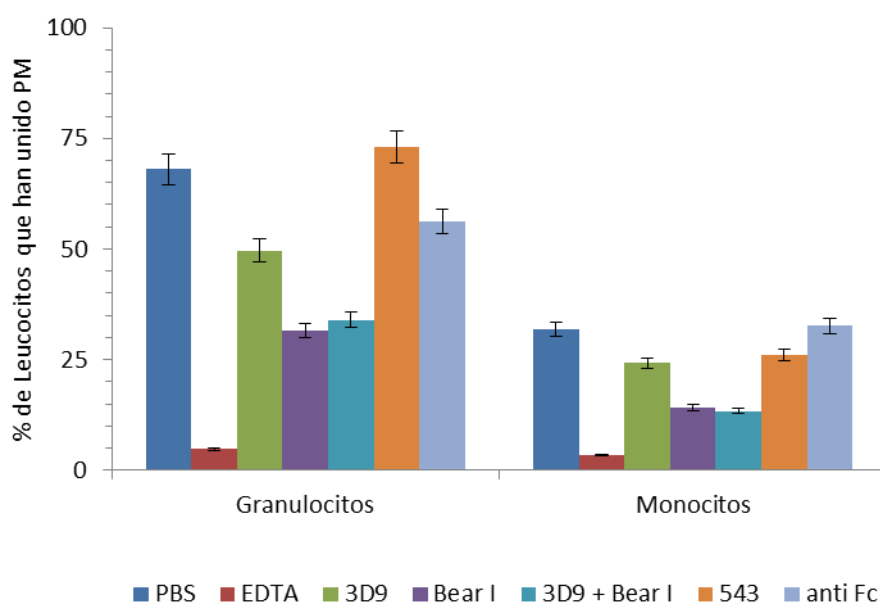
La Figura 4.15 muestra las tres cinéticas de IA de promastigotes de *L. amazonensis* a eritrocitos humanos sin tratar y pre-tratados con el AcM 3D9 o con el AcM 543. Solo la pre-incubación con el AcM 3D9 inhibía la reacción de IA, siendo el porcentaje de promastigotes unidos a los eritrocitos no superior al 10%. Similar tratamiento con el AcM 543 no tenía efecto sobre la reacción de IA y los parásitos se unían a los eritrocitos con una cinética propia de la reacción de IA; a los 20 segundos, el 30% de los promastigotes ya estaba unido a eritrocitos formando complejos de IA, alcanzándose el máximo de unión antes del minuto de incubación (90% a los 50 segundos). En presencia de eritrocitos no tratados la cinética de IA fue idéntica. Estos resultados indican que la interacción del promastigote opsonizado con el eritrocito se produce entre el CR1 del hematíe y el ligando C3b del complemento depositado en la superficie del promastigote, y confirma resultados previos de nuestro laboratorio (23).



**Figura 4.15. Inhibición de la cinética de inmunoadherencia de *L. amazonensis* y eritrocitos humanos.**  $10 \times 10^6$  promastigotes-CMFDA se opsonizaron con SHN al 25%, en presencia de  $E_H$  al 40%, preincubados con el AcM 3D9 (■), y el AcM 543 (●). Como control del ensayo positivo se utilizaron eritrocitos humanos incubados con PBS (▲). (Media  $\pm$  EE, n= 3).

## 2) Tratamiento de leucocitos:

Para clarificar si en la interacción de los promastigotes de los complejos de IA con los leucocitos aceptores están implicados los receptores CR1, CR3 y FcR celulares, se bloquearon dichos receptores con los AcM antiCR1 (3D9 y 543) antiCR3 (Bear I) y anti Fc (CD16, CD32). Como controles positivo y negativo se utilizaron PBS y EDTA (10 mM final), respectivamente.



**Figura 4.16. Inhibición de la transferencia de promastigotes a granulocitos y monocitos de la sangre.**  $10 \times 10^6$  promastigotes-CMFDA se añadieron a una muestra de sangre reconstituida cuyos leucocitos había sido pretratados previamente con los AcM indicados en la leyenda. Los valores representados en la gráfica están normalizados frente al total de leucocitos que unen promastigotes (100%). (Media  $\pm$  EE n= 4)

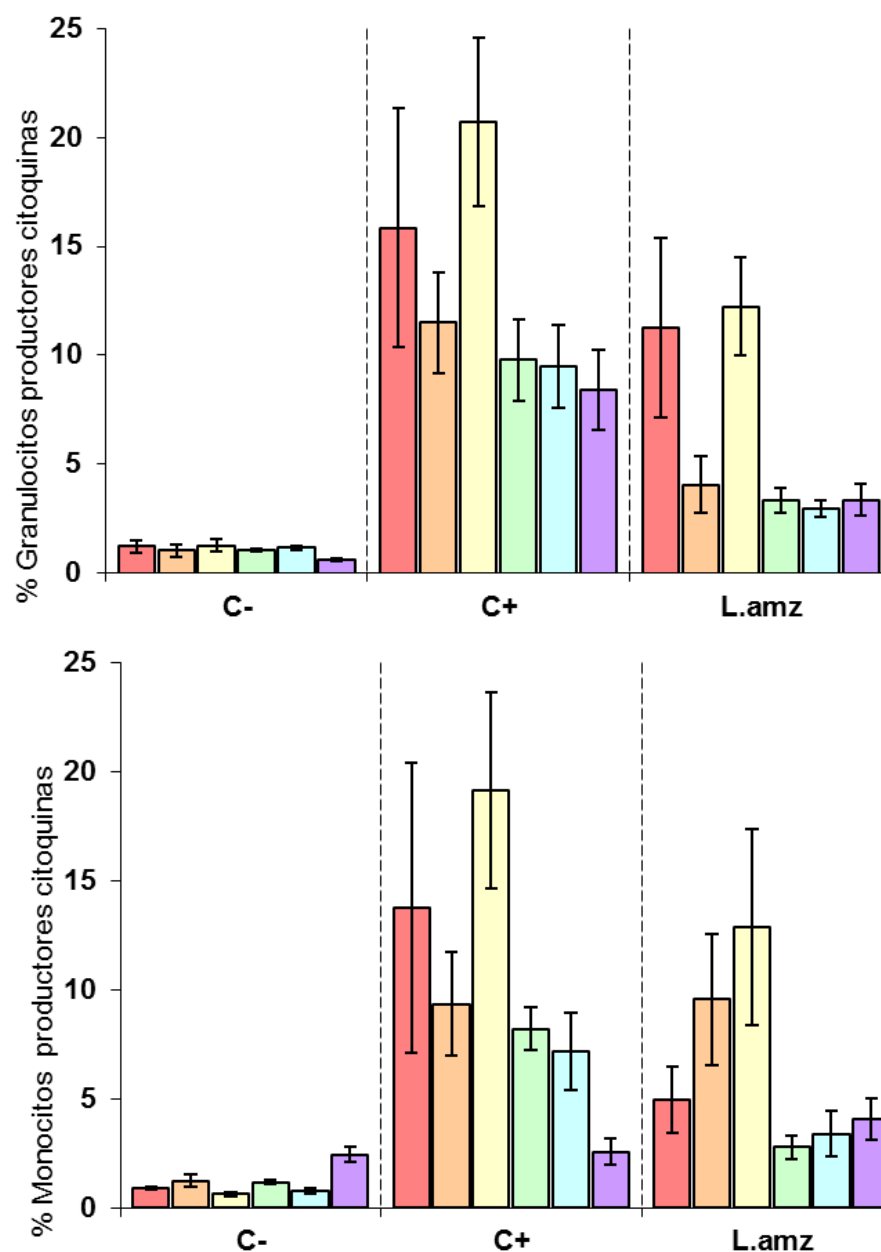
La Figura 4.16 muestra el porcentaje de leucocitos que unía promastigotes tras 5 minutos de infección habiendo sido bloqueados los receptores celulares anteriormente citados. Al bloquear el CR1 tras preincubar los leucocitos con el AcM 3D9 disminuye el porcentaje de unión de los parásitos en  $\sim 29\%$  (granulocitos) y  $\sim 25\%$  (monocitos) respecto a la unión a leucocitos sin tratar (control). El bloqueo del CR3 causa una mayor inhibición ( $\sim 50\%$ ) en los porcentajes de unión de granulocitos y monocitos tanto si se preincubaban con Bear I como conjuntamente con Bear I y 3D9. En contraste, los porcentajes de unión de granulocitos y monocitos tratados con el AcM 543 fueron similares a los de los leucocitos tratados con PBS. Para comprobar si la unión de los promastigotes a la célula aceptora tiene lugar por una vía independiente del complemento, como son los receptores Fc para las inmunoglobulinas, se realizaron ensayos de infección de sangre preincubando los leucocitos con los AcM CD16 y AcMCD32 (antiFcR) o con una mezcla de ambos. Los resultados fueron similares a los obtenidos cuando los leucocitos se preincubaban con PBS, no observándose inhibición apreciable en monocitos y un  $\sim 20\%$  en granulocitos.

## **4.2.-CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR TRAS LA INFECCIÓN DE LA SANGRE HUMANA POR *LEISHMANIA***

### **4.2.1.- Expresión de citoquinas por granulocitos y monocitos durante la infección ex vivo de sangre humana con promastigotes de *L. amazonensis*.**

Sangre humana, diluida al 50% con RPMI se infectó con promastigotes de *L. amazonensis*, como control positivo y negativo del ensayo se utilizó sangre estimulada con PMA y sangre sin tratar. Las muestras se incubaron a 37°C durante 15min; en ese punto se les añadió brefeldina (10µg/ml) y un ionóforo de calcio (1 µg/ml) y se prologó la incubación durante 4 horas más. Alícuotas de 100 µl de sangre se incubaron con AcM antiCD14-FITC y antiCD15 FITC para identificar las principales poblaciones leucocitarias. Tras la lisis de los eritrocitos las muestras se fijaron y permeabilizaron para proceder al marcaje intracelular de las citoquinas sintetizadas por las células según se describe en 3.6.1. Tras la incubación, las células lavadas se analizaron en el citómetro de flujo para determinar los porcentaje de granulocitos y monocitos que expresaban las siguientes citoquinas: IFN $\gamma$ , IL4, TGF $\beta$ 1 , IL10 , IL12 y TNF $\alpha$ .

La Figura 4.17 muestra los porcentajes de granulocitos y monocitos productores de los seis tipos de citoquinas analizados tras infectar sangre completa con promastigotes de *L. amazonensis* durante 4 horas.



**Figura 4.17. Producción de citoquinas por leucocitos tras la infección por *Leishmania* de una muestra de sangre humana.** Se incubaron muestras de sangre con promastigotes de *L. amazonensis* o ionomicina-PMA (C+) o PBS (C-). Se determinó por citometría los porcentaje de granulocitos y monocitos que generaron las siguientes citoquinas: IFN $\gamma$  (■), IL4 (■), TGF $\beta$ 1 (■), IL10 (■), IL12 (■) y TNF $\alpha$  (■) después de 4 horas de infección. (Media  $\pm$  EE, n= 6).

El tratamiento de la sangre con PMA-ionomicina estimula la expresión de las seis citoquinas en granulocitos y monocitos, a excepción del TNF $\alpha$  que en monocitos solo se expresa en el 2,6% de los mismos. En la sangre infectada con *L. amazonensis* los granulocitos expresan mayoritariamente IFN $\gamma$  (11.25%) y TGF $\beta$ 1 (12.22%), y los monocitos



IL4 (9.55%) y TGF $\beta$ 1 (12.86%). El control negativo no alcanzaba valores superiores al 2.5% para ninguna de las citoquinas estudiadas. Los valores obtenidos en estos ensayos se muestran en la Tabla. 4.3.

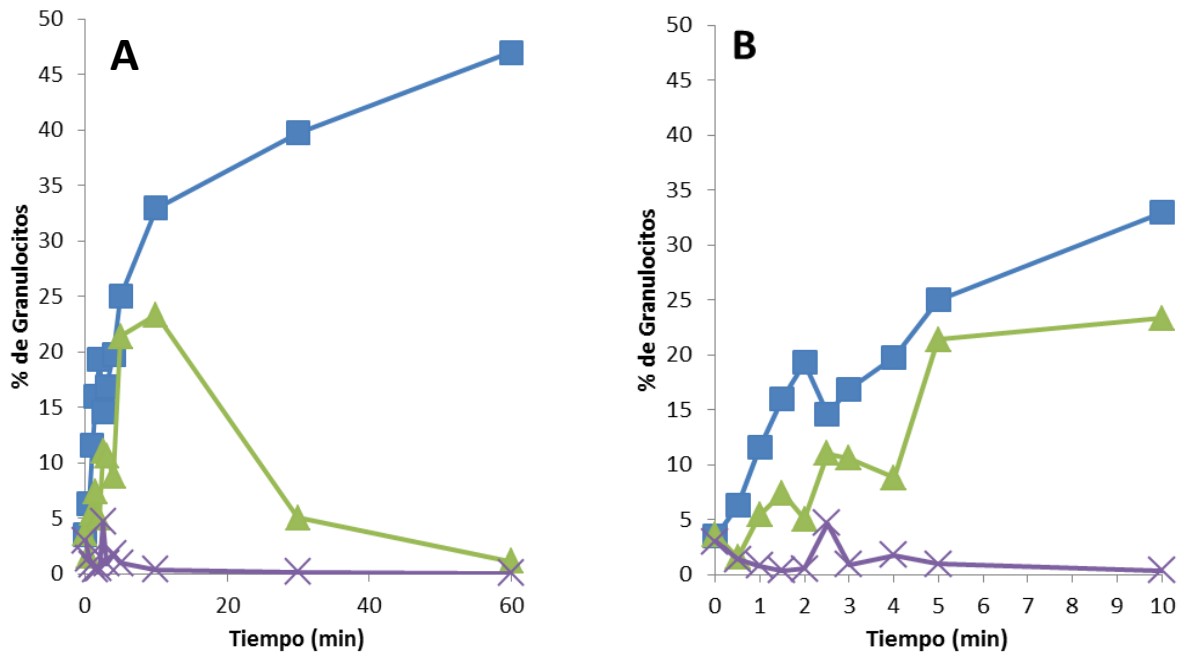
		Citoquina					
		IFN $\gamma$	IL4	TGF $\beta$ 1	IL10	IL12	TNF $\alpha$
Granulocitos	C+	15.8	11.49	20.7	9.78	9.48	8.41
	C-(PBS)	1.22	1.02	1.26	1.06	1.14	0.60
	<i>L. amazonensis</i>	<b>11.25</b>	4.05	<b>12.22</b>	3.33	2.94	3.35
Monocitos	C+	13.75	9.33	19.12	8.19	7.15	2.59
	C-(PBS)	0.89	1.22	0.60	1.15	0.76	2.42
	<i>L. amazonensis</i>	4.91	<b>9.55</b>	<b>12.86</b>	2.75	3.38	4.07

Tabla 4.3. Porcentajes de granulocitos o monocitos que unen cada una de las IL analizadas.

#### 4.2.2.-Producción de especies reactivas de oxígeno en granulocitos de sangre humana tras la infección ex vivo por *Leishmania*

Uno de los métodos microbicidas que emplean las células fagocíticas para destruir parásitos intracelulares es la generación de intermediarios reactivos derivados del oxígeno (ROS) que provocan la oxidación de las estructuras del patógeno. Para medir la producción de ROS por los granulocitos de sangre infectada por *Leishmania*, se realizó una infección de sangre suplementada con 10 mM H<sub>2</sub>DCFDA. La población de granulocitos se seleccionó en un diagrama por tamaño y complejidad y dentro de esta población se midió la subpoblación positiva a FL1 (fluorescencia debida a la oxidación de H<sub>2</sub>DCFDA) a cada tiempo. Análogamente, se realizó otra infección con promastigotes marcados con CMFDA pero sin añadir H<sub>2</sub>DCFDA. En este caso, la señal fluorescente se debe a los promastigotes-CMFDA unidos a los granulocitos. Como control negativo, se utilizó sangre tratada con EDTA. El resultado de este análisis se muestra en la Fig. 4.17. Durante los cinco primeros minutos de unión, el curso de las cinéticas de la señal debida a la unión de los promastigotes-CMFDA a los granulocitos y la debida a la fluorescencia generada por los granulocitos que experimentan el "burst" respiratorio eran muy similares. Sin embargo, a partir de 10 minutos de infección las cinéticas difieren drásticamente, y mientras la unión

de promastigotes a los granulocitos aumenta moderadamente a lo largo de la incubación, la debida a los granulocitos que experimentan el "burst" respiratorio disminuye drásticamente hasta alcanzar valores basales.



**Figura 4.17. Cinética granulocitos que producen ROS.** Se realizó un infección ex vivo con promastigotes de *L. amazonensis* durante 60 minutos en sangre humana suplementada con 10 uM  $H_2DCFDA$ . (▲) 10mM EDTA (●) y sin suplementar (■). El panel B corresponde a la representación ampliada de los 10 primeros minutos.

## 5.- DISCUSIÓN



En este estudio se describen las etapas por las que transcurre el proceso infectante de *Leishmania*, que se inicia cuando el flebótomo inocula el promastigote en el hospedador y termina en las horas que siguen a su interiorización en los fagocitos humanos. Se parte del supuesto de que la infección natural ocurre en el hematoma. No obstante, en el caso de que el parásito fuera depositado en tejido intradérmico no sería de esperar que el mecanismo de infección fuera muy distinto. Durante la picadura, el flebótomo busca específicamente una fuente de sangre para alimentarse y lacera los capilares dérmicos causando su extravasación al tejido circundante. En el caso de que el promastigote fuera depositado en una zona de la dermis carente de sangre se opsonizaría igualmente, ya que el líquido intersticial, como exudado del suero contiene las opsoninas; además, los monocitos tisulares, al igual que los monocitos *in vitro*, tienen capacidad para sintetizar todos los componentes del complemento y generar el sistema hemolítico (77)(78). Por tanto, la opsonización del promastigote debería proceder de manera similar en el hematoma y en el tejido intersticial.

La primera reacción celular que experimenta el promastigote al entrar en contacto con la sangre es con el eritrocito para formar el complejo de IA. En sangre humana *ex vivo*, la formación de este complejo es muy rápida y a los 30 segundos de iniciada la incubación la reacción alcanza su máximo (23). En este estudio, para analizar la cinética de formación del complejo de IA, hemos empleado un abordaje reduccionista partiendo de los componentes individuales del sistema: promastigote, suero humano y hematíes. El curso de la formación del complejo viene dado por la señal fluorescente proporcionada por los promastigotes marcados con CMFDA, y al igual que en sangre normal, la formación del complejo a partir de los reactantes individuales sigue una cinética similar, de modo que entre los 20 y 40 segundos la reacción se ha completado (Fig. 4. 2A, 4. 2B). Al microscopio óptico, los complejos de IA formados a partir de los componentes individuales se visualizan como rosetas de eritrocitos nucleados alrededor de un promastigote (Fig. 4. 1). Se postula, que la reacción de IA funciona como un potente mecanismo opsonizante que elimina, a través de los fagocitos mononucleares, una variedad de ICs y agentes varios (células senescentes, bacterias, parásitos) que están opsonizados por C3 (79)(32)(80). En nuestro laboratorio, se había estudiado la reacción de IA de promastigotes opsonizados por suero homólogo con células aceptoras de 4 géneros de vertebrados primates (eritrocitos) y 13 géneros no primates (plaquetas), y se concluía que la reacción de IA actúa como un

mecanismo efector del sistema inmunitario innato (81). Para analizar si la unión del eritrocito humano al promastigote está restringida por el origen del género del suero opsonizante, se realizaron experimentos con promastigotes de *L. amazonensis* opsonizados con suero humano, de conejo y de ratón y, posteriormente, se incubaron con los eritrocitos de las tres especies. El resultado indica que los eritrocitos humanos forman complejos de IA con promastigotes opsonizados por los sueros de las tres especies (Fig. 4. 3), mientras que los eritrocitos de conejo y ratón, que carecen del receptor para el C3, no unen promastigotes opsonizados si exceptuamos un porcentaje no superior al 20%, presumiblemente debido a reacciones inespecíficas de los AcN. Por tanto, la reacción de IA está determinada filogenética y tisularmente por la expresión del receptor de la célula aceptora; por otra parte, no parece improbable que dado el constreñimiento funcional del componente C3, el suero de diversos géneros de mamíferos sea capaz de mediatizar la reacción de IA con eritrocitos de primates. Teniendo en cuenta que la mayoría de las leishmaniosis son de origen zoonótico, el análisis comparado de la opsonización del promastigote y la reacción de IA en distintos géneros de vertebrados pudiera alumbrar aspectos clave para comprender la susceptibilidad de los distintos taxones a la infección.

Parece lógico hipotetizar, que si la reacción de IA representa la primera interacción del promastigote con las células de la sangre del hospedador, pueda tener una función adaptativa que favorezca la infección. Un mecanismo de esta naturaleza sería la transformación del promastigote-C3b a promastigote-C3bi tras la unión del primero al receptor CR1 del hematíe. El fragmento C3bi es el ligando del receptor CR3 de leucocitos, o lo que es lo mismo, la principal puerta de entrada del parásito en la célula durante la transferencia.

Otra función de la reacción de IA favorable al parásito sería que la unión del promastigote opsonizado al eritrocito le protegiera de la citotoxicidad del complemento. La incubación de los promastigotes opsonizados con suero humano en presencia y ausencia de eritrocitos, es decir con y sin reacción de IA, no alteró la cinética de muerte de los parásitos que en ambos casos alcanza el 95% a los dos minutos (Fig. 4. 4). Se concluye, que la adherencia del promastigote opsonizado a los eritrocitos no le protege frente al complemento.

Otra posible función adaptativa de la reacción IA consistiría en promover la transferencia de los parásitos desde el eritrocito a los leucocitos de la sangre acelerando la interiorización del promastigote; de este modo, los parásitos tendrían mayor probabilidad de evadir la presión selectiva de la cascada lítica del complemento. Para apoyar este supuesto era necesario demostrar que los promastigotes adheridos a los eritrocitos son liberados en presencia de leucocitos aceptores. Para ello, se prepararon muestras de sangre reconstituidas a partir de sus componentes individuales, una de las cuales había sido despojada de leucocitos. Tras la infección, la formación del complejo de IA alcanzaba el máximo al primer minuto, y a partir de ese momento se producía una rápida liberación de los promastigotes (25% entre el primer y segundo minutos) de los complejos de IA formados en la sangre completa; en la sangre carente de leucocitos, el promastigote no se disociaba de los eritrocitos, lo que indica que los leucocitos actúan como célulasceptoras de los parásitos (Fig. 4. 5). La importancia de la formación de los complejos de IA para la transferencia del promastigote viene dada por el hecho de que en complejos formados con promastigotes opsonizados durante 15 minutos solo un 5% de los leucocitos une promastigotes, mientras que la unión llega a ser del 21% si los promastigotes han sido opsonizados durante 1 minuto. Dado que durante la interiorización el promastigote parece comportarse pasivamente (este vivo o muerto), es probable que el fallo en la transferencia de los promastigotes opsonizados durante 15 minutos se deba al paso del C3b a C3bi, lo que impide la unión del promastigote opsonizado al eritrocito. El resultado de la Fig. 4. 15, muestra que los promastigotes opsonizados por C3 se unen selectivamente al epítipo del receptor CR1 reconocido por el AcM 3D9 y no al que reconoce el AcM 543. Del mismo modo, los promastigotes opsonizados con C3bi serían incapaces de unirse al CR1 y formar complejos de IA.

Para analizar el mecanismo de infección *ex vivo* de sangre humana por promastigotes de *L. amazonensis* hemos procurado equiparar las concentraciones de los componentes de la mezcla de reacción a las que se estima ocurren en la naturaleza. Se calcula, que en la infección natural el flebótomo ingiere 0,5  $\mu$ l de sangre y libera alrededor de 5000 promastigotes (9)(76)(82). Si en 1  $\mu$ l de sangre de un adulto humano hay  $5 \times 10^6$  eritrocitos y  $5 \times 10^3$  leucocitos, en 0,5  $\mu$ l de hematoma la proporción de promastigotes/eritrocitos sería de 1/500, y la de promastigotes/leucocitos de 2/1. Con objeto de mantener en lo posible esa relación para infectar *ex vivo* de 100  $\mu$ l de sangre se

utilizaron 10  $\mu$ l de promastigotes-CMFDA a  $10^8$ /ml, lo que da una relación promastigotes/eritrocitos y promastigotes/leucocitos semejante a la calculada en la infección natural. Como se muestra en las Fig. 4. 10A y 4. 10B), a los 5 minutos de infección el 13% de los leucocitos unían promastigotes distribuidos según: 76,3% granulocitos (CD15+), 10,7% + 0.15% CD14+ (monocitos), 2,7% +0.1% CD3+(linfocitos T), 8.5% + 0.2% CD19+(linfocitos B), 1.3% +0.02% células CD3- CD56+ (células NK) y 0.49% + 0.03% células CD209+. El porcentaje de células que unen promastigotes está directamente relacionado con la proporción de cada subpoblación celular en la sangre y la expresión de receptores para fragmentos del componente C3 del complemento (83). Así, la concentración de granulocitos excede entre 6 y 8 veces la de monocitos, linfocitos B y células T, y entre uno o dos órdenes de magnitud la de las células NK y las células CD209+. Granulocitos y monocitos pertenecen a poblaciones frecuentemente relacionadas con la infección por *Leishmania*. En la interacción inicial del parásito con las células de la sangre merece destacarse el alto porcentaje de unión de promastigotes por los linfocitos B (8,5 %), una proporción cercana a la que unen los monocitos (10,7%). Se sabe que los linfocitos B expresan receptores de superficie para el complemento a través de los cuales pueden presentar antígenos a monocitos/macrófagos (28), y diversos estudios han involucrado a las células B en la respuesta inmunitaria del ratón anti*Leishmania* en relación tanto con la susceptibilidad (84)(85)(86)(87) como la resistencia al parásito (88).

Como se indicó anteriormente, la velocidad de incorporación (unión + interiorización) de los promastigotes a los leucocitos sería un factor importante en apoyo o rechazo de la idea de que la reacción de IA promueve la infección. Para medirla, se determinó la cinética (0-60 minutos) de incorporación de promastigotes-CMFDA a granulocitos y monocitos en sangre heparinizada, calculándose el porcentaje de cada subpoblación que incorporaba parásitos. El curso de la incorporación de promastigotes por granulocitos y monocitos es hiperbólico, pero durante el periodo inicial (0-5 minutos) la incorporación a los leucocitos es prácticamente lineal (Fig. 4. 14 A-C). Al intervalo de tiempo comprendido entre los 0-3 minutos lo consideramos el periodo eficaz de infección ya durante ese tiempo una parte sustancial del inóculo de promastigotes se mantiene aún viable a la acción del complemento humano (89). La naturaleza del suero es muy relevante en la infección por *Leishmania*, ya que su capacidad citocida varía según el género del hospedador. En el caso de una infección en el ratón, el inóculo de *Leishmania* no estaría afectado por el complemento, ya que suero

del ratón no es lítico; en este caso, el complemento promueve activamente la interiorización del parásito.

A los 3 minutos de la infección, el porcentaje de la población de granulocitos que ha unido: interiorizado promastigotes es del 12%: 5%, y el de monocitos de 7%: 2%. Suponiendo que los 100  $\mu$ l de sangre contienen aproximadamente  $5 \times 10^5$  leucocitos de los cuales el 56% son granulocitos y el 7% monocitos, resulta que alrededor de 14.000 granulocitos y 700 monocitos han interiorizado promastigotes (vivos + muertos) en el ensayo *ex vivo*. Estos datos, obtenidos tras 3 minutos de infección, muestran la rapidez y eficacia del proceso infectante y sugieren que la reacción de IA juega un papel relevante en la transferencia del parásito a las células aceptoras.

Granulocitos y monocitos/macrófagos comparten la mayoría de los receptores del complemento, los cuales son la principal puerta de entrada de *Leishmania* en la célula (83). Promastigotes opsonizados por complemento se unen a monocitos/macrófagos humanos principalmente a través de los receptores CR1 y CR3 del complemento (47)(59). Los resultados obtenidos en nuestros ensayos confirman que anticuerpos antiCR1 (AcM 3D9) inhiben la unión de los parásitos a los granulocitos (29%) y monocitos (25%) de la sangre; por el contrario, el AcM 543 dirigido frente a un epítipo del CR1 que no participa en el reconocimiento del C3b carece de capacidad inhibitoria. En concordancia con los resultados de otros investigadores (59)(90) el bloqueo del receptor CR3 con el AcM Bear-1 produce la mayor inhibición (~ 50%) tanto en granulocitos como en monocitos, indicando que el CR3 es la principal puerta de entrada del parásito en los leucocitos de sangre humana (Fig. 4.16). La inhibición causada por el uso conjunto del Bear-1 y el 3D9 no superó la obtenida solamente con el Bear-1. Una probable explicación sería que la degradación del C3b a C3bi fuerza que el promastigote se una al receptor CR3, en línea con la propuesta de que una función del receptor CR1 de leucocitos y hematíes es generar ligandos para el CR3 a partir de C3b (59)(91). Se ha descrito que la opsonización de promastigotes con anticuerpos potencia su entrada en macrófagos humanos, lo que sugiere la intervención de receptores Fc $\gamma$ R en el proceso (92). Nuestros resultados no evidencian que los receptores Fc $\gamma$ R participen en el proceso.



El contexto de la infección (sangre, tejido dérmico) juega un papel importante en la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias que probablemente determinan el posterior desarrollo de la respuesta adaptativa Th-1/Th-2 frente al parásito (93). En sangre humana, granulocitos y monocitos son dos de las tres poblaciones involucradas en la interacción inicial con *Leishmania*. El granulocito infectado tiene vida media muy corta ( $t_{\frac{1}{2}} \sim 6-8$  horas), y a pesar de su transitoriedad permite la supervivencia del parásito en su interior; en la actualidad, se le considera un importante vehículo de transmisión de promastigotes a los macrófagos (94). A las cuatro horas de la infección de sangre con promastigotes de *L. amazonensis* (Fig. 4. 17, y Tabla 4. 3), los granulocitos expresan intracitoplasmáticamente IFN $\gamma$  (11,25%) y TGF $\beta$  (12,22 %). Otras citocinas analizadas: IL-4 (4,05%) IL-10 (3,33%), IL-12 (2,9%) y TNF $\alpha$  (3,35%) superan ligeramente el nivel de los controles, pero no parece que se hayan inducido por el parásito. En los monocitos, la expresión corresponde principalmente a IL-4 (9,55%) y TGF $\beta$  (12,86%); cabe anotar también un moderado nivel de IFN $\gamma$  (4,91%). Las citocinas expresadas por monocitos son supresoras y favorecen la viabilidad del parásito, siempre que no se considere expresión el bajo nivel de IFN $\gamma$  detectado. En granulocitos, la expresión de IFN $\gamma$  y TGF $\beta$  parece tener un carácter funcional opuesto. En ambos casos, no queda claro el papel que desempeña el IFN $\gamma$  en un microambiente supresor. Dos de las tres linfocinas con mayor nivel de expresión se sabe que modulan distintas funciones del macrófago. TGF $\beta$  es esencial para el implante de la infección, controla el inicio y desarrollo de la respuesta inflamatoria y actúa como potente inhibidor de la actividad microbicida del macrófago (70). IL-4 dirige la diferenciación de las células Th-2, la población canónica que exacerba la infección en el ratón (93). Neutrófilos humanos infectados con promastigotes estacionarios de carácter apoptótico (anexinaA5+) de *L. major* inducen la liberación de TGF $\beta$ , citocina que aumenta la viabilidad del parásito (94); igualmente, en macrófagos humanos, TGF $\beta$  en concentraciones fisiológicas inhibe la eliminación de *L. chagasi* (95). Recientemente, en un estudio de expresión de mRNA de citocinas en granulocitos (PMN) estimulados con *L. major*, se detectó mRNA de IL-1 y IL-4 pero no de TGF $\beta$  ni de IFN $\gamma$  (96). Diferencias en la especie y desarrollo del parásito, la preparación celular utilizada y el tipo de ensayo, pueden explicar las discrepancias en los resultados. Nuestros datos indican que durante la infección *ex vivo* de sangre humana por promastigotes de *L. amazonensis* las células estimuladas generan un microambiente de citocinas antiinflamatorias de carácter supresor que facilitaría el desarrollo de la infección.

Finalmente, se analizó el desencadenamiento del estallido respiratorio (ROS) en los leucocitos de la sangre infectada para determinar si la invasión del parásito transcurre a través de un proceso silencioso que promueve su supervivencia. En los primeros minutos de la infección, el porcentaje de leucocitos que unían promastigotes (~ 25%) era el mismo que el porcentaje en que se activaba el estallido respiratorio (Fig. 4. 17A y 17B). A partir de los 10 minutos, el número de leucocitos activados caía abruptamente aunque la fijación de parásitos a las células seguía su curso. El rápido inicio del ROS indica que la infección de sangre humana por *Leishmania* no es silente como se había descrito (61). Otros autores han publicado que promastigotes y amastigotes de *L. donovani* activan el estallido respiratorio en granulocitos y monocitos humanos, pero mientras que la mayoría de los promastigotes mueren por la oxidación, los amastigotes sobreviven (2). El estallido respiratorio se dispara tempranamente y de manera simultánea a la infección, pero es de corta duración (Fig. 4. 17A), mientras en otro estudio similar la activación de ROS se prolonga más en el tiempo (97). De aquí que consideremos que la corta vida del estallido respiratorio en nuestro ensayo pueda estar constreñida por el TGF $\beta$  expresado por los leucocitos tras la infección. Una explicación similar se ha dado para explicar la viabilidad de *L. chagasi* en macrófagos humanos (95). En conclusión, la supervivencia de *Leishmania* es el resultado del equilibrio entre la respuesta innata del hospedador (complemento, estallido respiratorio, digestión lisosómica) y la estrategia de invasión del parásito (reacción de IA, ventana temporal de infección, microambiente supresor).

## 6.- CONCLUSIONES



1. La reacción de inmunoadherencia, primera interacción de *Leishmania* con las células de la sangre, no protege al parásito de la lisis por complemento, pero mediatiza la transferencia del promastigote a los leucocitos.
2. La infección progresa cuando los promastigotes son transferidos desde los complejos de inmunoadherencia a las dos principales poblaciones aceptoras de la sangre, granulocitos y monocitos, que interiorizan los parásitos.
3. La fagocitosis de los promastigotes es dependiente del componente C3 del complemento; la principal vía de entrada pasa por la unión del ligando C3bi depositado en la superficie del promastigote al receptor CR3 de la célula diana.
4. Los promastigotes liberados por el complejo de inmunoadherencia se detectan en la célula diana a partir de los treinta segundos de iniciada la infección. El mecanismo de transferencia es un fenómeno extremadamente rápido, que en buena parte transcurre con anterioridad a la muerte del parásito por el complemento. El período ventana comprendido entre el comienzo de la infección y la muerte del promastigote constituye una ventana temporal de supervivencia para *Leishmania*.
5. La interiorización del promastigote dispara el estallido respiratorio de los leucocitos, e induce la expresión de citocinas principalmente inflamatorias que generan un microambiente de carácter inhibitorio de la activación celular.

## 7.- RESUMEN



## RESUMEN

### Introducción

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos hemoflagelados del género *Leishmania* que se transmite al hombre y a otros vertebrados a través de la picadura de un díptero de la familia *Plebotominae*. Cuando un flebótomo infectado pica al hospedador vertebrado, perfora la piel con su probóscide buscando las vénulas de la dermis, las lacera y provoca un pequeño hematoma donde deposita los promastigotes. Tras el contacto con la sangre tiene lugar la activación del complemento y deposición del C3 en la superficie del parásito. En primates, los promastigotes opsonizados se unen a eritrocitos y posteriormente son transferidos a las células aceptoras de la sangre: los leucocitos

### Objetivo

Profundizar en el análisis del mecanismo de infección *ex vivo* de sangre humana por promastigotes de *Leishmania*, estableciendo la secuencia de interacciones celulares desde que el parásito entra en contacto con la sangre hasta la interiorización en las células fagocíticas.

### Materiales y Métodos

La Citometría de flujo fue, principalmente, la herramienta utilizada como técnica analítica. La cinética de unión de *Leishmania* a células sanguíneas, se llevaron a cabo con promastigotes marcados con un derivado de fluoresceína (CMFDA) que permitió seguir el curso de la reacción mediante la detección de los mismos en el canal de FL1 en un citómetro de flujo FACScalibur. Para diferenciar entre promastigotes unidos y promastigotes interiorizados apantallamos la fluorescencia de los parásitos que estaban unidos a la superficie celular empleando azul tripano. Para identificar las poblaciones de leucocitos a las que se unen inicialmente los promastigotes de *Leishmania* realizamos un doble marcaje empleando promastigotes-CMFDA y AcM específicos frente a cada población de granulocitos (anti CD15), monocitos (anti CD14), linfocitos B (anti CD19), linfocitos T (anti CD3), células NK (anti CD56), células dendríticas (anti CD209). Por último, la caracterización de la respuesta celular tras la infección la realizamos midiendo la expresión de citocinas intracelulares con AcM específicos (IFN  $\gamma$ , IL4, TGF  $\beta$ 1, IL10, IL12 y TNF $\alpha$ ) y

la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) con derivados de la fluoresceína (H2DCFDA).

## Resultados

Confirmamos la reacción de inmunoadherencia (IA) que tiene lugar entre los promastigotes de *Leishmania*, el complemento y los eritrocitos humanos. Así mismo, caracterizamos la cinética de formación de dichos complejos. La unión es extremadamente rápida; comienza alrededor de los 20 segundos de incubación, y a los 40 segundos un 90% ha finalizado. No obstante pudimos observar que la formación del complejo de IA no protege a los promastigotes de la acción citotóxica del complemento humano y en contacto con este se produce la muerte de la práctica totalidad de los parásitos.

Una vez descartado el posible efecto protector del eritrocito frente a la acción tóxica del complemento, se abordó el estudio de la interacción de los promastigotes que son vehiculados desde los complejos de IA a las células fagocíticas profesionales de la sangre. Identificamos las poblaciones celulares involucradas en el proceso de infección. Para simular en lo posible el mecanismo infectante natural se desarrolló un modelo de infección "ex vivo" de sangre humana heparinizada utilizando una dosis de promastigotes que fuera del orden de la regurgitada por la hembra del flebótomo durante la infección natural. A los 5 minutos de infección el 13% de los leucocitos de la sangre unían promastigotes de los cuales el 10,7% + 0.15% eran monocitos, el 76,3% + 0.8% eran granulocitos, el 2,7% + 0.1% eran linfocitos T, el 8.5% + 0.2% eran linfocitos B, el 1.3% + 0.02% eran células NK y el 0.49% + 0.03% eran células CD209+. Sin embargo, comprobamos que solo granulocitos y monocitos internalizaban promastigotes. El estudio de la cinética de interiorización de los promastigotes de *L. amazonensis* a granulocitos y monocitos humanos, se llevó a cabo con promastigotes en una infección de sangre ex vivo a lo largo de 60 minutos. A los 30 minutos, alrededor del 39,2 % (94% del total unido) de los granulocitos han fijado promastigotes mientras que los monocitos lo han hecho en un 23, 5% (76% del total unido). Transcurridos 5 minutos de infección, que lo hemos establecido como periodo de ventana, la proporción de leucocitos que habían unido: interiorizado promastigotes fue 20%:8% en granulocitos y de 10%:3% en monocitos. Y comprobamos que los receptores mayoritariamente utilizados para la interiorización de los parásitos en ambas subpoblaciones leucocitarias serán el CR1 y el CR3.

Finalmente, estudiamos la respuesta de los leucocitos como efecto de la infección de *Leishmania*, extendiéndolo al patrón de producción de citoquinas y a la de producción de especies reactiva de Oxígeno (ROS). En la sangre infectada con *L. amazonensis* los granulocitos expresan mayoritariamente IFN  $\gamma$  y  $\text{TGF}\beta 1$  (12.22%), y los monocitos IL4 y  $\text{TGF}\beta 1$ . En cuanto a la producción de ROS, durante los cinco primeros minutos de unión, el curso de las cinéticas la unión de los promastigotes los granulocitos y la del "burst" respiratorio eran muy similares. Sin embargo, a partir de 10 minutos de infección las cinéticas difieren drásticamente, y mientras la unión de promastigotes a los granulocitos aumenta moderadamente a lo largo de la incubación, la debida a los granulocitos que experimentan el "burst" respiratorio disminuye drásticamente hasta alcanzar valores basales.

### **Discusión and conclusión**

Para conocer la secuencia de reacciones que sufre el parásito tras su inoculación, hemos desarrollado un modelo de infección *ex vivo* en sangre humana que trata de emular la situación fisiológica existente en el hematoma dérmico. Al entrar los promastigotes en contacto con el suero del hospedador se opsonizan por anticuerpos naturales y complemento, depositándose ligandos de C3b en la superficie del parásito. La primera interacción celular del promastigote es con los eritrocitos del hospedador, una reacción de inmunoadherencia que se establece entre el ligando C3b del promastigote y el receptor CR1 del hematíe. Hemos profundizado en el análisis cinético de este mecanismo y comprobado que aunque la inmunoadherencia no protege al parásito de la actividad lítica del complemento sí promueve la transferencia de los promastigotes a los granulocitos y monocitos, principales células aceptoras de la sangre; de este modo, los promastigotes liberados del complejo de inmunoadherencia se detectan en las células diana a partir de los 30 segundos de iniciada la infección. La interiorización de los promastigotes dispara el estallido respiratorio en los leucocitos e induce la expresión de citocinas principalmente inflamatorias que generan un microambiente de carácter supresor. Estos datos indican que la invasión de los leucocitos humanos por los promastigotes es un mecanismo extremadamente rápido y eficiente, y sugieren que la reacción de inmunoadherencia constituye la primera estrategia invasiva del parásito para evadir los mecanismos de la inmunidad innata del hospedador vertebrado.



## **8.- SUMMARY**



## **SUMMARY**

### **Introduction**

The leishmaniosis are vector-borne diseases caused by trypanosomatid protozoa of the genus *Leishmania*. These parasites have a heteroxenous life cycle, living as extracellular flagellated promastigotes in the digestive tract of the insect vector and as obligate intracellular sessile amastigotes within mononuclear phagocytes in vertebrate hosts. *Leishmania* is transmitted to susceptible vertebrate hosts through the bite of infected sandflies of the genus *Phlebotomus*. Phlebotomine sandflies are hematophagous diptera that feed from hematomas; infected females inoculate promastigotes into hematomas in host skin while probing for dermal capillaries. After blood contact, promastigotes are opsonized by host serum factors that trigger complement activation and C3 deposition on parasites. In primate blood, C3-opsonized promastigotes immunoadhere to erythrocytes and in non-primate mammalian blood, to platelets. Erythrocyte-bound promastigotes are subsequently shuttled to acceptor blood leukocytes and the C3-coated parasites are endocytosed by polymorphonuclear (PMN) phagocytes and monocytes. Inside phagolysosomes of permissive leukocytes, promastigotes differentiate to amastigotes and establish infection.

### **Objective**

To clarify the early cellular mechanisms of human blood infection by *Leishmania* promastigotes which include, promastigote-erythrocyte IA reaction --> promastigote binding and internalization in granulocytes and monocytes, and promastigote triggering of cytokine expression and the oxidative burst by infected leukocytes.

### **Materials and Methods**

Flow cytometry was mainly used as an analytical tool technique. The binding kinetics of *Leishmania* blood cells, were carried out with promastigotes labeled with a fluorescein derivative (CMFDA) allowed to follow the course of the reaction by detecting in the FL1 channel (530nm) in FACSCalibur flow cytometer. The percentage of cells that internalized promastigotes was determined using trypan blue to quench the extracellular fluorescence emitted by cell-bound CMFDA-labeled promastigotes. To measure initial blood leukocyte binding of opsonized *Leishmania*, we identified leukocyte subpopulation with fluorochrome-

labeled anti-CD15 (for granulocytes), -CD14 (monocytes), -CD3 (T cells), -CD19 (B cells), -CD56+ (NK cells) and -CD209 (monocyte/dendritic cells) mAb. Finally, to characterization of the cellular response after infection the performed measuring the expression of specific intracellular cytokine using mAb (IFN  $\gamma$ , IL4, TGF  $\beta$ 1, IL10, IL12 and TNF) and production of reactive oxygen species (ROS) with fluorescein derivatives (H2DCFDA).

## Results

To clarify the early Leishmania invasion period we developed an ex vivo protocol of human blood infection with promastigotes. After blood contact promastigotes are opsonized by natural antibodies and complement and the opsonized promastigotes undergo an immune adherence (IA) reaction and bind to CR1 receptors on erythrocytes. In humans serum cytotoxic activity against promastigotes is a major effector mechanism during the early Leishmania invasion period and after 2.5 minutes of serum contact 90% of promastigotes are killed. Given that Leishmania IA is the first parasite-host cellular interaction we analyzed whether Leishmania IA would protect promastigotes from complement lysis, and found that it does not. An important function of IA is to enhance phagocytosis of opsonized immune complexes and microbes. Promastigote IA may thus facilitate progress of infection by transferring erythrocyte-adherent parasites to blood phagocytes. We show that IA reaction is an efficient mechanism to shuttle erythrocyte-bound promastigotes to acceptor leukocytes. After 5 min incubation, 13% of leukocytes bound promastigotes, of which 10.7% $\pm$ 0.15% were CD14+, 76.3% $\pm$ 0.8% CD15 +, 2.7% $\pm$ 0.1% CD3+, 8.5% $\pm$ 0.2% CD19+, 1.3% $\pm$ 0.02% CD32 CD56+ and 0.49% $\pm$ 0.03% CD209+ cells. A substantial fraction of B cells (8.5%) bound promastigotes in this early period, but only granulocytes and monocytes internalized promastigotes. We analyzed the time-course of granulocyte and monocyte binding to promastigotes and found that it was linear over the first 5 to 10 minutes. After 30 minutes approximately 39.2 % (94% of total bound) of granulocytes and 23, 5% (76% of total bound) monocytes had bound promastigotes. After 5 minutes of infection the percentage of leukocytes that bound: internalized promastigotes was 20% $\pm$ 8% (granulocytes) and 10% $\pm$ 3% (monocytes). In addition, we show that the main functional receptors used by promastigotes to enter the cells are CR1 y el CR3 which recognize C3b and C3bi ligands, respectively.

Subsequently, we investigated whether parasite infection induced cytokine expression and triggered the oxidative burst reaction (ROS) in leukocytes. In human blood

infected by promastigotes of *L. amazonensis* the percentage of granulocytes which expressed cytokines were IFN $\gamma$  (11.25%) and TGF $\beta$ 1 (12.22%), and in the case of monocytes IL4 (9.55%) and TGF $\beta$ 1 (12,86%). Finally, we confirmed that granulocytes trigger ROS production immediately after infection; nevertheless, at 10 minutes post-infection ROS production falls to background level.

## **Discussion and Conclusions**

To investigate the sequence of early reactions that undergoes the parasite during host infection we used an *ex vivo* protocol of human blood infection which mimics the physiological conditions in the human blood pool. Previous studies had shown that the first cellular interaction of opsonized promastigotes was with erythrocytes, a reaction called immune adherence which is mediated by the binding of promastigote C3b ligands to CR1 receptors on erythrocytes. We show that promastigote immune adherence does not protect the parasite from complement lysis, but rather it stimulates promastigote transfer and internalization into granulocytes and monocytes. Promastigote binding/internalization to human leukocytes triggers the respiratory burst and the expression of inflammatory cytokines by the cells creating an inhibitory microenvironment which helps parasite proliferation. These data indicate that *Leishmania* invasion of human leukocytes is an extremely rapid and efficient mechanism, and suggest that the immune adherence reaction is the first evasion strategy of the parasite to circumvent host innate immunity.

## 9.- BIBLIOGRAFÍA



### Reference List

1. Gossage,S.M., M.E.Rogers, and P.A.Bates. 2003. Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 33:1027-34.
2. Pearson,R.D., D.A.Wheeler, L.H.Harrison, and H.D.Kay. 1983. The immunobiology of leishmaniasis. *Rev.Infect.Dis*. 5:907-927.
3. Killick-Kendrick,R. 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 4:1-24.
4. Alvar,J. Las Leishmaniasis: de la Biología al Control. 2001. Ref Type: Generic
5. Bern,C., J.H.Maguire, and J.Alvar. 2008. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS.Negl.Trop.Dis*. 2:e313.
6. Desjeux,P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27:305-18.
7. Wincker,P., C.Ravel, C.Blaineau, M.Pages, Y.Jauffret, J.P.Dedet, and P.Bastien. 1996. The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res*. 24:1688-1694.
8. Bastien,P. 1992. Comparison of Leishmania infections in sandflies fed with two types of feeders. *Ann.Trop.Med.Parasitol*. 86:309-310.
9. Bastien,P., C.Blaineau, and M.Pages. 1992. Leishmania: sex, lies and karyotype. *Parasitol.Today* 8:174-177.

10. Rogers,M.E., T.Ilg, A.V.Nikolaev, M.A.Ferguson, and P.A.Bates. 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430:463-7.
11. Oliveira,F., P.G.Lawyer, S.Kamhawi, and J.G.Valenzuela. 2008. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-Leishmania immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2:e226.
12. Gomes,R., F.Oliveira, C.Teixeira, C.Meneses, D.C.Gilmore, D.E.Elnaiem, S.Kamhawi, and J.G.Valenzuela. 2012. Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted leishmania conferring ulcer-free protection. *J.Invest Dermatol.* 132:2735-2743.
13. de Moura,T.R., F.Oliveira, G.C.Rodrigues, M.W.Carneiro, K.F.Fukutani, F.O.Novais, J.C.Miranda, M.Barral-Netto, C.Brodskyn, A.Barral, and C.I.de Oliveira. 2010. Immunity to Lutzomyia intermedia saliva modulates the inflammatory environment induced by Leishmania braziliensis. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 4:e712.
14. Chagas,A.C., F.Oliveira, A.Debrabant, J.G.Valenzuela, J.M.Ribeiro, and E.Calvo. 2014. Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases Leishmania parasite survival in neutrophils and inhibits XIIa contact activation in human plasma. *PLoS.Pathog.* 10:e1003923.
15. Gomes,R. and F.Oliveira. 2012. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on leishmania immunity. *Front Immunol.* 3:110.
16. Dominguez,M., I.Moreno, M.Lopez-Trascasa, and A.Torano. 2002. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J Exp Med* 195:451-9.

17. Dominguez,M. and A.Torano. 2001. Leishmania immune adherence reaction in vertebrates. *Parasite Immunol* 23:259-65.
18. 2006. The Immune Response, Basic and Clinical Principles. Academic Press.
19. Kawai,T. and S.Akira. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 34:637-650.
20. Shaw,P.J., M.Lamkanfi, and T.D.Kanneganti. 2010. NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *Eur.J.Immunol*. 40:624-627.
21. Kufer,T.A., J.H.Fritz, and D.J.Philpott. 2005. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol*. 13:381-388.
22. Avrameas,S. 1991. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 12:154-9.
23. Dominguez,M. and A.Torano. 1999. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of Leishmania infection. *J Exp Med* 189:25-35.
24. Konishi,E. 1993. Naturally occurring antibodies that react with protozoan parasites. *Parasitol Today* 9:361-4.
25. Nelson,R.A., Jr. 1953. The immune-adherence phenomenon; an immunologically specific reaction between microorganisms and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis. *Science* 118:733-7.
26. Schmunis,G.A. and R.Herman. 1970. Characteristics of so-called natural antibodies in various normal sera against culture forms of Leishmania. *J Parasitol* 56:889-96.



27. Nardin,A., R.Schlimgen, V.M.Holers, and R.P.Taylor. 1999. A prototype pathogen bound ex vivo to human erythrocyte complement receptor 1 via bispecific monoclonal antibody complexes is cleared to the liver in a mouse model. *Eur.J.Immunol* 29:1581-1586.
28. Lindorfer,M.A., H.B.Jinivizian, P.L.Foley, A.D.Kennedy, M.D.Solga, and R.P.Taylor. 2003. B cell complement receptor 2 transfer reaction. *J.Immunol* 170:3671-3678.
29. Hess,C. and J.A.Schifferli. 2003. Immune adherence revisited: novel players in an old game. *News Physiol Sci* 18:104-8.
30. Klickstein,L.B., S.F.Barbashov, T.Liu, R.M.Jack, and A.Nicholson-Weller. 1997. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity*. 7:345-355.
31. Ghiran,I., S.F.Barbashov, L.B.Klickstein, S.W.Tas, J.C.Jensenius, and A.Nicholson-Weller. 2000. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J.Exp.Med*. 192:1797-1808.
32. Birmingham,D.J. 1995. Erythrocyte complement receptors. *Crit Rev.Immunol*. 15:133-154.
33. Alexander,J.J., B.K.Hack, P.N.Cunningham, and R.J.Quigg. 2001. A protein with characteristics of factor H is present on rodent platelets and functions as the immune adherence receptor. *J Biol Chem* 276:32129-35.
34. Cornacoff,J.B., L.A.Hebert, D.J.Birmingham, and F.J.Waxman. 1984. Factors influencing the binding of large immune complexes to the primate erythrocyte CR1 receptor. *Clin.Immunol.Immunopathol*. 30:255-264.

35. Cornacoff, J.B., L.A. Hebert, W.L. Smead, M.E. VanAman, D.J. Birmingham, and F.J. Waxman. 1983. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J. Clin. Invest* 71:236-247.
36. Waxman, F.J., L.A. Hebert, J.B. Cornacoff, M.E. VanAman, W.L. Smead, E.H. Kraut, D.J. Birmingham, and J.M. Taguam. 1984. Complement depletion accelerates the clearance of immune complexes from the circulation of primates. *J. Clin. Invest* 74:1329-1340.
37. Rossi, M. and J.W. Young. 2005. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* 175:1373-1381.
38. Merad, M. and F. Ginhoux. 2007. Dendritic cell genealogy: a new stem or just another branch? *Nat. Immunol.* 8:1199-1201.
39. Zhao, C., R. Cantin, M. Breton, B. Papadopolou, and M.J. Tremblay. 2005. DC-SIGN-mediated transfer of HIV-1 is compromised by the ability of *Leishmania infantum* to exploit DC-SIGN as a ligand. *J. Infect. Dis.* 191:1665-1669.
40. Mosser, D.M. 1994. Receptors on phagocytic cells involved in microbial recognition. *Immunol. Ser.* 60:99-114.
41. Brittingham, A., C.J. Morrison, W.R. McMaster, B.S. McGwire, K.P. Chang, and D.M. Mosser. 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.* 155:3102-3111.
42. Akilov, O.E., R.E. Kasuboski, C.R. Carter, and M.A. McDowell. 2007. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. *J. Leukoc. Biol.* 81:1188-1196.

43. Moreno,I., M.Dominguez, D.Cabanes, C.Aizpurua, and A.Torano. 2010. Kinetic analysis of ex vivo human blood infection by Leishmania. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 4:e743.
44. Ambrosio,A.R. and I.J.De Messias-Reason. 2005. Leishmania (Viannia) braziliensis: interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. *Parasite Immunol* 27:333-40.
45. da Silva,R.P., B.F.Hall, K.A.Joiner, and D.L.Sacks. 1989. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages. *J.Immunol.* 143:617-622.
46. Guy,R.A. and M.Belosevic. 1993. Comparison of receptors required for entry of Leishmania major amastigotes into macrophages. *Infect.Immun.* 61:1553-1558.
47. Mosser,D.M. and P.J.Edelson. 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes. *J.Immunol.* 135:2785-2789.
48. Kima,P.E., S.L.Constant, L.Hannum, M.Colmenares, K.S.Lee, A.M.Haberman, M.J.Shlomchik, and D.McMahon-Pratt. 2000. Internalization of Leishmania mexicana complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J.Exp.Med.* 191:1063-1068.
49. Ueno,N., C.L.Bratt, N.E.Rodriguez, and M.E.Wilson. 2009. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic Leishmania infantum chagasi promastigotes. *Cell Microbiol.* 11:1827-1841.

50. Chang,K.P. 1981. Leishmania donovani-macrophage binding mediated by surface glycoproteins/antigens: characterization in vitro by a radioisotopic assay. *Mol.Biochem.Parasitol.* 4:67-76.
51. Anderson,C.F. and D.M.Mosser. 2002. Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J.Immunol.* 168:3697-3701.
52. Peters,C., T.Aebischer, Y.D.Stierhof, M.Fuchs, and P.Overath. 1995. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of Leishmania mexicana amastigotes. *J.Cell Sci.* 108 ( Pt 12):3715-3724.
53. Woelbing,F., S.L.Kostka, K.Moelle, Y.Belkaid, C.Sunderkoetter, S.Verbeek, A.Waisman, A.P.Nigg, J.Knop, M.C.Udey, and S.E.von. 2006. Uptake of Leishmania major by dendritic cells is mediated by Fcgamma receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J.Exp.Med.* 203:177-188.
54. Kane,M.M. and D.M.Mosser. 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J.Immunol.* 166:1141-1147.
55. Miles,E.A., P.Zoubouli, and P.C.Calder. 2005. Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. *Clin.Nutr.* 24:780-784.
56. Madi,N., J.P.Paccaud, G.Steiger, and J.A.Schifferli. 1991. Immune complex binding efficiency of erythrocyte complement receptor 1 (CR1). *Clin.Exp.Immunol.* 84:9-15.
57. Quadri,R.A. and J.A.Schifferli. 1992. Over-estimation of the number of complement receptor type 1 (CR1) on erythrocytes. *Scand.J.Immunol.* 36:125-130.
58. Holers,V.M. 2014. Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu.Rev.Immunol.* 32:433-459.

59. Rosenthal,L.A., F.S.Sutterwala, M.E.Kehrli, and D.M.Mosser. 1996. Leishmania major-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect.Immun.* 64:2206-2215.
60. Awasthi,A., R.K.Mathur, and B.Saha. 2004. Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res* 119:238-58.
61. Wright,E.P. and E.R.el Amin. 1989. Leishmania infection: surfaces and immunity. *Biochem.Cell Biol.* 67:525-536.
62. Buates,S. and G.Matlashewski. 2001. General suppression of macrophage gene expression during Leishmania donovani infection. *J.Immunol.* 166:3416-3422.
63. Olivier,M., D.J.Gregory, and G.Forget. 2005. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18:293-305.
64. Liew,F.Y., Y.Li, and S.Millott. 1990. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide. *J.Immunol.* 145:4306-4310.
65. Belosevic,M., D.S.Finbloom, P.H.Van Der Meide, M.V.Slayter, and C.A.Nacy. 1989. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with Leishmania major. *J.Immunol.* 143:266-274.
66. Grassme,H., V.Jendrosseck, and E.Gulbins. 2001. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. *Apoptosis.* 6:441-445.

67. Santos,J.L., A.A.Andrade, A.A.Dias, C.A.Bonjardim, L.F.Reis, S.M.Teixeira, and M.F.Horta. 2006. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN-gamma/LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. *J.Interferon Cytokine Res.* 26:682-688.
68. Matte,C., G.Maion, W.Mourad, and M.Olivier. 2001. Leishmania donovani-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol.* 23:177-184.
69. Barral-Netto,M., A.Barral, C.E.Brownell, Y.A.Skeiky, L.R.Ellingsworth, D.R.Twardzik, and S.G.Reed. 1992. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257:545-548.
70. Gantt,K.R., S.Schultz-Cherry, N.Rodriguez, S.M.Jeronimo, E.T.Nascimento, T.L.Goldman, T.J.Recker, M.A.Miller, and M.E.Wilson. 2003. Activation of TGF-beta by Leishmania chagasi: importance for parasite survival in macrophages. *J.Immunol.* 170:2613-2620.
71. Kane,M.M. and D.M.Mosser. 2000. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr.Opin.Hematol.* 7:26-31.
72. Murray,H.W., C.M.Lu, S.Mauze, S.Freeman, A.L.Moreira, G.Kaplan, and R.L.Coffman. 2002. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect.Immun.* 70:6284-6293.
73. Grazia,C.M., F.S.Sutterwala, G.Trinchieri, D.M.Mosser, and X.Ma. 2001. Suppression of Il-12 transcription in macrophages following Fc gamma receptor ligation. *J.Immunol.* 166:4498-4506.

74. Chu,N., B.N.Thomas, S.R.Patel, and L.U.Buxbaum. 2010. IgG1 is pathogenic in *Leishmania mexicana* infection. *J.Immunol.* 185:6939-6946.
75. Dominguez,M., I.Moreno, M.Lopez-Trascasa, and A.Torano. 2002. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J Exp Med* 195:451-9.
76. Kimblin,N., N.Peters, A.Debrabant, N.Secundino, J.Egen, P.Lawyer, M.P.Fay, S.Kamhawi, and D.Sacks. 2008. Quantification of the infectious dose of *Leishmania* major transmitted to the skin by single sand flies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105:10125-10130.
77. McPhaden,A.R. and K.Whaley. 1993. Complement biosynthesis by mononuclear phagocytes. *Immunol.Res.* 12:213-232.
78. Johnson,E. and G.Hetland. 1988. Mononuclear phagocytes have the potential to synthesize the complete functional complement system. *Scand.J.Immunol.* 27:489-493.
79. Nelson,D.S. Immune adherence. *Adv Immunol* . 1963. Ref Type: Journal (Full)
80. Nardin,A., R.Schlimgen, V.M.Holers, and R.P.Taylor. 1999. A prototype pathogen bound ex vivo to human erythrocyte complement receptor 1 via bispecific monoclonal antibody complexes is cleared to the liver in a mouse model. *Eur.J.Immunol* 29:1581-1586.
81. Dominguez,M. and A.Torano. 2001. *Leishmania* immune adherence reaction in vertebrates. *Parasite Immunol* 23:259-65.

82. Warburg,A. and Y.Schlein. 1986. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 35:926-930.
83. Leslie. 2001. Encyclopedia of Life Sciences.
84. Hoerauf,A., M.Rollinghoff, and W.Solbach. 1996. Co-transfer of B cells converts resistance into susceptibility in T cell-reconstituted, *Leishmania major*-resistant C.B-17 scid mice by a non-cognate mechanism. *Int.Immunol* 8:1569-1575.
85. Smelt,S.C., S.E.Cotterell, C.R.Engwerda, and P.M.Kaye. 2000. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J.Immunol* 164:3681-3688.
86. Wanasen,N. and S.L.Xin L. 2008. *Int.J.Parasitol* 38:417-429.
87. Ronet,C., H.Voigt, H.Himmelrich, M.A.Doucey, T.Y.Hauyon-La, M.Revaz-Breton, F.Tacchini-Cottier, C.Bron, J.Louis, and P.Launois. 2008. *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c mice. *J.Immunol* 180:4825-4835.
88. Sacks,D.L., P.A.Scott, R.Asofsky, and F.A.Sher. 1984. Cutaneous leishmaniasis in anti-IgM-treated mice: enhanced resistance due to functional depletion of a B cell-dependent T cell involved in the suppressor pathway. *J.Immunol* 132:2072-2077.
89. Dominguez,M., I.Moreno, C.Aizpurua, and A.Torano. 2003. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes.Infect.* 5:507-513.
90. Laufs,H., K.Muller, J.Fleischer, N.Reiling, N.Jahnke, J.C.Jensenius, W.Solbach, and T.Laskay. 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil



granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors.  
*Infect.Immun.* 70:826-835.

91. Sutterwala,F.S., L.A.Rosenthal, and D.M.Mosser. 1996. Cooperation between CR1 (CD35) and CR3 (CD 11b/CD18) in the binding of complement-opsonized particles. *J.Leukoc.Biol.* 59:883-890.
92. Sara Noureldyme Mohamed<sup>1</sup>,E.A.G.K.A.M.M.B.M.Y.S.A.O.A.H.S.a.A.M.E.-H. 2012. Anti-Leishmania donovani antibodies enhance promastigotes internalization into host macrophage. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 4:110-114.
93. Sacks,D. and N.Noben-Trauth. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. *Nat.Rev.Immunol.* 2:845-858.
94. Laskay,T., Z.G.van, and W.Solbach. 2003. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11:210-214.
95. Gant<sup>t</sup>,K.R., S.Schultz-Cherry, N.Rodriguez, S.M.Jeronimo, E.T.Nascimento, T.L.Goldman, T.J.Recker, M.A.Miller, and M.E.Wilson. 2003. Activation of TGF-beta by Leishmania chagasi: importance for parasite survival in macrophages. *J.Immunol.* 170:2613-2620.
96. Keyhani,A., F.Riazi-Rad, S.R.Pakzad, and S.Ajdary. 2014. Human polymorphonuclear leukocytes produce cytokines in response to Leishmania major promastigotes. *APMIS* 122:891-897.
97. Rebbestad,K., S.Herredsvella, S.Sornes, G.E.Eide, K.E.Muller, E.Spriet, H.Sjursen, and A.Naess. 2012. Flow cytometry technique for analysing Leishmania

promastigote phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes and monocytes.

*Parasite Immunol.* 34:528-535.

#### Publicaciones científicas

1. **"Kinetic Analysis of Ex Vivo Human Blood Infection by Leishmania"**. Inmaculada Moreno, Mercedes Domínguez, Darío Cabañes, Carmen Aizpurua, Alfredo Torano. Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain.